Versuche zum Mechanismus der viralen Persistenz in Zellen am Beispiel des Paramyxovirus 6/94

Wolfgang Neubert

1979

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie
in Martinsried bei München
Abteilung für Virusforschung

Versuche zum Mechanismus der viralen Persistenz in Zellen am Beispiel des Paramyxovirus 6/94

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Neubert
aus Velenje

München, Mai 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der Einreichung der Arbeit: 18. Juni 1979
1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schmieger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Böck
Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 1979

MEINER TOCHTER

BIRGIT

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535722_0059

INHALTSVERZEICHNIS Seite

ZUSAMMENFASSUNG 1

1. EINLEITUNG 3
1.1. Allgemeiner Teil 3
1.1.1. Viren und neurologische Erkrankungen 3
1.1.2. Die Multiple Sklerose 4
1.1.3. Epidemiologische Studien zur M.S. 5
1.1.4. Hinweise auf Viren im Zusammenhang mit der M.S. 8
1.1.5. Virusisolationen aus Geweben von M.S.-Patienten 9
1.2. Spezieller Teil: Das 6/94 Virus 13
1.2.1. Isolierung des 6/94 Virus aus Gehirnzellen von M.S.-Patienten 13
1.2.2. Klassifikation des 6/94 Virus 15
1.2.3. Infektion von Zell-Kulturen und Versuchstieren mit dem 6/94 Virus 17
1.2.4. Klonierung der fusionierten Gehirnzellen 20
1.2.5. Nachweis von latenten Viren 23

PROBLEMSTELLUNG 27

2. MATERIAL UND METHODEN 28
2.0. Material 28
2.0.0. Puffer und Lösungen 29
2.1. Virusvermehrung 31
2.1.1. Virusvermehrung in Zellkultur 31
2.1.2. Virusvermehrung im bebrüteten Hühnerei 34
2.1.3. Züchtung von ^{3}H-markierten Viren in Zellkultur 35
2.1.4. Züchtung von ^{32}P-markierten Viren in Zellkultur 35
2.2. Virusreinigung und Charakterisierung 36
2.2.1. Fraktionierte Zentrifugation in Sucrose-Gradienten 36
2.2.2. Pelletieren der Viren im Winkelrotor 37
2.2.3. Kombinierte Ultrafiltration und Ultrazentrifugation zur Reinigung von Viren aus großen Volumina 37

Seite

2.2.4. Elektronenmikroskopie 38
2.2.5. Hämagglutinations-Hemmungstest 39
2.3. Isolierung und Reinigung von 6/94 RNA 39
2.3.1. Isolierung von RNA aus gereinigten 6/94 Viren 39
2.3.2. Messung von UV-Spektren der Nucleinsäuren 40
2.3.3. Sucrosegradienten zur Auftrennung von Nucleinsäuren mit unterschiedlichem s-Wert 41
2.3.4. Bestimmung der spezifischen Aktivität von Nucleinsäuren 42
2.4. Markierung und Isolation von zellulären Nucleinsäuren 43
2.4.1. Markierung von zellulärer gesamt-RNA 43
2.4.2. Markierung von virusspezifischer RNA in Zellen 43
2.4.3. Extraktion von gesamt-RNA aus Zellen 43
2.4.4. Isolierung von poly-A haltiger RNA 44
2.4.5. Markierung von zellulärer DNA mit Tritium 45
2.4.6. Isolierung von DNA aus Zellen 45
2.5. Synthese von virusspezifischer ^{3}H-cDNA 46
2.5.1. In-vitro ^{3}H-cDNA Synthese System 46
2.5.2. Messung der säurefällbaren Radioaktivität in Nucleinsäuren 47
2.5.3. Reinigung der cDNA 47
2.6. In-vitro Synthese von virusspezifischer ^{3}H-cRNA 48
2.6.1. In-vitro cRNA Synthese System 48
2.6.2. Reinigung der ^{3}H-cRNA 49
2.7. Flüssighybridisierungssystem 49
2.8. Charakterisierung von Nucleinsäurehybriden 50
2.8.1. Dichtegradienten-Analyse 50
2.8.2. Enzymatischer Abbau von Nucleinsäuren 51
2.8.3. Schmelzkurven 52
2.9. Sicherheitsmaßnahmen beim Arbeiten mit Viren 52

3. ERGEBNISSE 54
3.1. Ergänzende Vorarbeiten 54
3.1.1. Schärfere Nachweismethoden für RNA/cDNA Hybride 55
3.1.2. Optimierung der 6/94 cDNA Synthese zur Erhöhung des einzelsträngigen Anteils 57

Seite

3.1.3. Präparative Synthese, Reinigung und Charakterisierung der 6/94 ^{3}H-cDNA 60

3.1.4. Nachweis der Spezifität der 6/94 cDNA durch Rückhybridisierung mit viraler RNA 63

3.1.5. Kritische Analyse des 6/94 Rückhybrids 65

3.2. Nachweis von 6/94 spezifischer RNA in den drei Fusionszell-Klonen mit Hilfe der 6/94 ^{3}H-cDNA 68

3.2.1. Hybridisierung von 6/94 ^{3}H-cDNA mit gesamt-RNA aus den drei Fusinszell-Linien 68

3.2.2. Schärfere Charakterisierung der Hybride aus Fusionszell RNA und 6/94 ^{3}H-cDNA 73

3.2.3. Bestimmung der Nachweisgrenze des Hybridisierungssystems mit 6/94 cDNA 78

3.2.4. Experimentelle Aussagen zur Polarität und transcribierten viralen Sequenz der 6/94 cDNA 83

3.3. Versuche zum Nachweis von virusspezifischer RNA in den Fusionszell-Linien durch selektive Markierung der 6/94 RNA 89

3.3.1. Nachweis von hochmolekularer 6/94 RNA durch direkte Markierung von virusspezifischer RNA in Fusionszellen 89

3.3.2. Überprüfung der Fusionszellen auf poly-A-haltige, virusspezifische RNA 93

3.4. Nachweis von 6/94 spezifischen DNA-Sequenzen in den drei Fusionszell-Linien 96

3.4.1. Reinigung von 6/94 Viren und Überprüfung des Isolates 96

3.4.2. Isolierung von viraler 6/94 ^{3}H-RNA 102

3.4.3. Charakterisierung der gereinigten 6/94 ^{3}H-RNA 105

3.4.4. Modellhybridisierung zur Etablierung eines Nachweissystems für virusspezifische DNA-Sequenzen 108

3.4.5. Untersuchung der drei Fusionszell-Linien auf 6/94-spezifische DNA-Sequenzen 114

3.4.6. Quantitative Abschätzung der 6/94 spezifischen DNA-Sequenzen pro Zelle 123

Seite

3.5. Verbesserung der Spezifität des Nachweissystems durch in-vitro synthetisierte 6/94 ^{3}H-cRNA 125

3.5.1. In-vitro Synthese von ^{3}H-cRNA an viraler 6/94 RNA 126

3.5.2. Optimierung der ^{3}H-cRNA Synthese an 6/94 RNA 128

3.5.3. Präparative Synthese, Reinigung und Charakterisierung von 6/94 ^{3}H-cRNA 130

3.5.4. Nachweis von 6/94 DNA-Sequenzen in den Fusionszell-Linien durch Hybridisierung mit 6/94 ^{3}H-cRNA 133

4. DISKUSSION 138

LITERATUR-VERZEICHNIS 152

ABKÜRZUNGEN 160

DANKSAGUNG

Lebenslauf

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß in Gehirnzellen von Multiple Sklerose Patienten, aus denen durch Zellfusionierung das infektiöse Paramyxovirus 6/94 freigesetzt werden konnte, virusspezifische RNA- und DNA-Sequenzen nachzuweisen sind.

Die Untersuchung der Zellen auf virusspezifische RNA erfolgt mit in-vitro synthetisierter complementär DNA (cDNA) durch Nucleinsäure-Hybridisierung. Durch Optimierung der Act.D Konzentration kann die cDNA vollständig als Einzelstrang synthetisiert werden; dadurch wird eine weitgehende Nuclease S1 Sensitivität erreicht; in präparativen Ansätzen synthetisierte cDNA wird durch verschiedene Charakterisierungen auf ihre Verwendbarkeit für die Hybridisierungsversuche überprüft. Durch enzymatischen Verdau, Dichtegradientenanalyse und Schmelzkurven werden die entstehenden Modellhybride eingehend untersucht. Auch bei kritischer Analyse erweist sich die 6/94 ^{3}H-cDNA als virusspezifisch.

Mit Hilfe dieser cDNA wird in drei bezüglich ihrer Virusproduktion unterschiedlichen Fusionszell-Linien nach virusspezifischer RNA gesucht. Die entstehenden Nucleinsäure-Hybride werden durch eingehende Charakterisierung überprüft. Nur Zellen, die auch nach serologischen und immunologischen Kriterien Viren produzieren, enthalten 6/94 RNA. Die Nachweisgrenze des Systems kann auf ein Virusgenom pro Zelle abgeschätzt werden. Die Nachweismöglichkeiten durch Hybridisierungen mit der cDNA werden diskutiert.

Durch selektive Markierung der viralen RNA in den Fusionszellen sollen auch solche Sequenzen erkennbar gemacht werden, die sich dem Nachweis durch 6/94 cDNA entziehen. Auch hier zeigt sich virale RNA bzw. virusspezifische mRNA nur in virusproduzierenden Fusionszellen. Damit läßt sich für eine virale Persistenz in Zellen durch virusspezifische RNA kein Hinweis erkennen.

Durch Hybridisierung mit hochgereinigter viraler 6/94 ^{3}H-RNA wird in den drei Fusionszell-Klonen nach virusspezifischen

DNA-Sequenzen gesucht. Die Züchtung und Reinigung der dazu benötigten 6/94 Viren wird beschrieben sowie deren serologische und elektronenmikroskopische Untersuchung. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit zellulärer RNA wird die Isolierung und Reinigung der viralen RNA sehr sorgfältig durchgeführt, als Ausgangsmaterial für die weiteren Versuche wird die 50s RNA abgetrennt. Nach Überprüfung der 6/94 ^{3}H-RNA in Kontrollexperimenten auf ihre Verwendbarkeit wird diese in Hybridisierungsversuchen mit gereinigter DNA aus den drei Fusionszell-Linien sowie mit DNA aus drei Kontrollzell-Linien eingesetzt. Nach kritischer Prüfung der entstandenen Hybride kann in den zwei virusproduzierenden Zell-Linien Cl-E-8 und Cl-F-2 virusspezifische DNA nachgewiesen werden. Eine Abschätzung ergibt rund 45 Genomäquivalente pro Zelle. Der nichtproduzierende Klon Cl-C-2 sowie die Kontrollzell-Linien ergeben keinerlei Hybridisierung mit der 6/94 ^{3}H-RNA.
Zur weiteren Absicherung dieser Ergebnisse wird in einem in-vitro System mit RNA-Polymerase aus E.coli 6/94 spezifische ^{3}H-cRNA synthetisiert. Als Matrize dient dabei RNA aus in Hühnereiern gezüchteten 6/94 Viren. Die Parameter dieses Systems werden optimiert und die präparativ synthetisierte 6/94 ^{3}H-cRNA charakterisiert. Wiederholungen der Hybridisierungsversuche mit DNA aus den drei Fusionszell-Linien und aus den Kontrollzellen bestätigen die Ergebnisse der Versuche mit in-vivo markierter 6/94 RNA, die Spezifität des Nachweises ist sichergestellt.
Damit ist auch in einem Fall von latent infizierten Patientenzellen das Auftreten virusspezifischer DNA eines Paramyxovirus sicher nachgewiesen.
Die Ergebnisse werden zu einem hypothetischen Modell der viralen Persistenz in Beziehung gesetzt und diskutiert.

1. EINLEITUNG

1.1. Allgemeiner Teil

1.1.1. Viren und neurologische Erkrankungen

"Sind alle degenerativen neurologischen Erkrankungen Infektionen mit langsamen Viren?" Mit dieser Frage beginnt Milton Alter einen Aufsatz in der Zeitschrift 'Geriatrics', in dem er die bis heute ungeklärte Ursache der degenerativen Erkrankungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) wieder erneut aufwirft (Alter et al.1977).
Bereits 1926 wurde von H.J.Turnbull berichtet, daß es im Anschluß an Impfungen zu neurologischen Komplikationen kommt (Turnbull et al.1926). Diese zeigten sich in morphologischen Veränderungen im Gehirn, ohne daß jedoch ein Eindringen der Viren in das ZNS nachzuweisen war. Da sich zu dieser Zeit die Virologie noch mit den klassischen Viruserkrankungen beschäftigte, die durch einen typischen und raschen Verlauf gekennzeichnet sind, gestand man den Viren bei den beobachteten Erkrankungen nur eine nebengeordnete Rolle zu; man sah die Symptome eher noch aus der Sicht einer 'entgleisten' Immunantwort. E.W.Hurst räumt in seinem Aufsatz von 1936 immerhin die Existenz von 'neurotropen' Viren ein.
Die Fragestellung wurde durch N.M.Gregg (Gregg 1944) erneut aufgeworfen, als dieser zeigen konnte, daß es durch intrauterine Infektion mit Rubella-Virus zu congenitalen Schädigungen, auch im ZNS-Bereich, kommt. Die Kinder mit Röteln-Embryopathien erwiesen sich als Träger und Ausscheider von infektiösen Viren bei gleichzeitig hohem Antikörper-Titer. Im Gegensatz zu den Impfkomplikationen konnte hier eine Beteiligung von aktiven Viren wahrscheinlich gemacht werden.
Einen weiteren wichtigen Beitrag zu diesem Thema leistete B.Sigurdsson Mitte der fünfziger Jahre mit seinem Konzept der 'Slow Virus Disease' (Sigurdsson 1954). Diese durch 'langsame Viren' ausgelösten Krankheiten im Veterinärbereich zeichnen

sich durch drei charakteristische Kriterien aus: 1) eine ungewöhnlich lange Inkubationszeit von Monaten bis zu Jahren; 2) ein protrahierter Krankheitsverlauf; 3) ein unabwendbares Ende der Krankheit, meistens der Tod. Durch diesen von einer klassischen Virusinfektion abweichenden Verlauf wurde ein neues Verständnis für den potentiellen Zusammenhang zwischen Viren und degenerativen Nervenerkrankungen beim Menschen ermöglicht.
Im Folgenden soll diskutiert werden, inwieweit sich diese Gedankengänge in Einklang bringen lassen mit experimentellen Befunden, die im Zusammenhang stehen mit einer häufigen neurologischen Erkrankung, der Multiplen Sklerose. Weiterhin wird die Frage untersucht, wie man sich den Verlauf einer solchen 'langsamen Virusinfektion' aus der Sicht des auslösenden Agens vorstellen kann und ob Verfahren denkbar sind, diese Viren spezifisch nachzuweisen.

1.1.2. Die Multiple Sklerose

Die am meisten verbreitete humane degenerative Nervenerkrankung ist die Multiple Sklerose (M.S.). Im Verlauf dieser Krankheit werden an verschiedenen Stellen im ZNS die Markscheiden der Nervenfasern aufgelöst. Dadurch wird die Nervenleitung in diesen Bereichen gestört. Die Entmarkung tritt nicht an einzelnen Nervenfasern auf, sondern immer herdförmig (Plaques). Plaques unterschiedlicher Größe sind über das gesamte Nervensystem verteilt und finden sich insbesondere im Bereich größerer Venen. Im frühen Stadium der Krankheit sind die Markscheiden geschwollen; meist zerfallen sie anschließend und werden durch Gliazellen, die 'Bindegewebszellen des Gehirns' ersetzt. Es kommt dabei zu einer Verhärtung mit Narbenbildung, zu einer 'Sklerose'.
Der Verlauf der Erkrankung ist durch schubweise Verschlimmerung der Symptome gekennzeichnet. Die Intervalle zwischen den Schüben schwanken von Fall zu Fall zwischen Monaten und Jahren. Im Anschluß an jeden Schub, der in der Regel bis zu

zwei Wochen andauert, kommt es normalerweise zu einer allmählichen spontanen Rückbildung der Symptome (Remission); diese ist aber meist nur unvollständig. Dadurch führt die Krankheit, durch Perioden des Stillstands und der Besserung unterbrochen, langsam und unaufhaltsam zum Tod des Patienten (Poeck 1978).
Zur Klärung der Ätiologie der Multiplen Sklerose sind in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt worden, die jedoch noch kein einheitliches Bild ergeben. Man kann diese Arbeiten nach mehreren übergeordneten Gesichtspunkten zusammenfassen: Studien über die Häufigkeit der M.S. bei unterschiedlichen Lebensbedingungen; Suche nach Viren oder virusähnlichen Agenzien, die gemeinsam mit der M.S. auftreten und in einem kausalen Zusammenhang zu ihr stehen; und schließlich Multiple Sklerose als Autoimmunerkrankung, ausgelöst durch endogene oder exogene Faktoren.
Zunächst sollen einige wichtige Ergebnisse referiert werden, die sich mit der Häufigkeit des Auftretens der Multiplen Sklerose befassen.

1.1.3. Epidemiologische Studien zur M.S.

Im Gegensatz zu Infektionskrankheiten wie Polio-Myelitis, Tuberkulose und Malaria sind bei der M.S. die Erkrankungsraten in den letzten fünfzig Jahren trotz geänderter Lebensbedingungen konstant geblieben. Alle Veränderungen der Ernährung, Hygiene, Arbeitsbelastung und Umweltbedingungen haben die Häufigkeit des Auftretens der Multiplen Sklerose nicht berührt (Brody 1972).
Ebenso zeigen sich keine Unterschiede durch ein Leben in ländlichen Gebieten oder in Städten (Poskanzer et al.1963).
Die M.S. ist keine nach den Mendelschen Gesetzen vererbare Krankheit; trotzdem liegt die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung über dem Durchschnitt, wenn bereits ein anderes Familienmitglied M.S. hat oder hatte (Alter et al.1976a). Frauen erkranken in der Regel häufiger als Männer. Der Ausbruch der

Krankheit ist nicht gleichmäßig über das gesamte Lebensalter verteilt. Meistens beginnt die M.S. zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr; ein deutliches Maximum liegt bei 30 Jahren; vor dem 15. und nach dem 55. Lebensjahr ist der Krankheitsbeginn selten (Poeck 1978, Nathanson et al.1978).
Einen wichtigen Platz bei den epidemiologischen Studien nehmen die Untersuchungen über die geographische Verteilung der Multiplen Sklerose ein. Hier zeigt sich ein Ansteigen der Erkrankungsfälle vom Äquator zu den gemäßigten Breiten hin. Während im Mittelmeergebiet die M.S. fast unbekannt ist, erreicht sie in England und Skandinavien eine Verbreitung von 50 oder mehr Erkrankungen pro 100.000 Einwohner. Zwischen diesen Extremen gibt es Abstufungen, außerdem sind in den Gebieten räumlich eng begrenzte 'Inseln' zu beobachten, die eine weit höhere oder niedrigere M.S.-Häufigkeit aufweisen. Die höchste bekannte Erkrankungsrate gibt es auf den Orkney- und Shetland-Inseln mit über 200 Fällen pro 100.000 Bewohner (Barlow 1971, Kurtzke et al.1971).
Einen besonders bemerkenswerten Fall stellt das Auftreten der M.S. auf den Faroer-Inseln dar: Bis zum Jahr 1943 war die Multiple Sklerose auf diesen Inseln unbekannt. Von 1940 bis 1944 wurden die Faroer-Inseln von englischen Truppen besetzt. Im Jahr 1943 traten dann die ersten M.S. Fälle auf, denen weitere Erkrankungen folgten. Es war eine Häufung des Krankheitsbeginns in den Jahren 1943-1950 und 1952-1962 zu beobachten. Anschließend waren nur noch wenige Neuerkrankungen zu verzeichnen. Dieses Zusammentreffen von Besetzung der Inseln durch das Militär und den Ausbruch einer bisher nicht aufgetretenen Krankheit legt den Schluß nahe, daß die Soldaten als Überträger eines unbekannten Agens "x" fungiert haben, das mit der M.S. in kausalem Zusammenhang steht (Kurtzke et al.1975).
Um diese Hypothese der Übertragung eines Agens "x" von der Aktivierung eines ubiquitären Virus abzugrenzen, wurden von S.D.Cook (Cook et al. 1978) Untersuchungen unternommen mit dem Ergebnis, hinter dem Agens "x" könne sich eventuell das Hundestaupe-Virus verbergen; dem zugrunde lag eine Hunde-

staupe-Epidemie 1940 nach Eintreffen der Engländer, während nach 1956 kein einziger Fall dieser Krankheit mehr auftrat.

Weitere Daten zur Ätiologie der Multiplen Sklerose ergaben sich aus epidemiologischen Untersuchungen an Auswanderern. Hier zeigte sich übereinstimmend, daß die einzelnen Personen in Abhängigkeit ihres Alters bei der Auswanderung, die für ihr Heimatland typische Häufigkeit an M.S. zu erkranken, in das neue Land mitnahmen (Alter et al. 1977a). Dies konnte besonders deutlich am Beispiel der Einwanderer nach Israel gezeigt werden. Nach Gründung des Staates Israel waren zwei große Einwanderer-Ströme zu beobachten, nämlich aus Europa (hohe M.S. Rate) und aus Afrika-Asien (niedrige M.S.Rate). Israel selbst liegt in einem Bereich mit mittlerer M.S.-Häufigkeit. Es zeigte sich, daß die Einwanderer das für ihr Heimatland typische Erkrankungsrisiko mitbrachten, wenn sie zur Zeit der Einwanderung älter als fünf Jahre waren. Waren sie hingegen jünger, trat die M.S. mit der für Israel charakteristischen Häufigkeit auf (Alter et al. 1966). Diese Beobachtungen konnten durch weitere Untersuchungen an Einwanderern nach Süd-Afrika bestätigt werden (Dean 1967).
Die Ergebnisse dieser beiden Studien demonstrieren eindrucksvoll die Komplexität der Ätiologie der Multiplen Sklerose: Für die Faroer-Inseln liegt der Schluß nahe, daß von den Engländern ein Agens "x" mitgebracht wurde, das entweder sofort (erste Erkrankungswelle 1943-1950) oder nach 10 bis 20 Jahren zum Ausbruch der Krankheit führte. Dagegen scheinen die europäischen Auswanderer nach Israel in den ersten fünf Lebensjahren gegen die Aufnahme eines M.S.-Erregers geschützt zu sein; erst nach dieser Zeit wird bei ihnen der Grundstein für eine spätere Erkrankung gelegt. In diesem Fall könnten andererseits, bedingt durch die Änderung des Lebensraumes, auch Stoffwechselveränderungen eine entscheidende Rolle am Auftreten der M.S. spielen. Die Diskrepanz zwischen dem sofortigen Ausbruch der Krankheit und Latenzzeiten von zwanzig, dreißig oder vierzig Jahren ist der Grund, weshalb manche Autoren die Existenz einer weiteren Determinante fordern;

deren Wirken bestimmt den Ausbruch der Krankheit und sie triggert auch die für die Multiple Sklerose charakteristischen Schübe (Brody 1972).

1.1.4. Hinweise auf Viren im Zusammenhang mit der M.S.

Die virale Genese der Multiplen Sklerose stand in den letzten 100 Jahren vielfach im Mittelpunkt der Untersuchungen. Bereits 1879 plädierten Kahler und Pick für eine Ätiologie infektiösen Ursprungs. Inzwischen sind eine Vielzahl von Viren in Verdacht geraten, mit der M.S. in Beziehung zu stehen, so z.B. einige Myxo-, Paramyxo- und Herpesviren, wie die Erreger von Röteln, Mumps, Influenza und Enzephalitis. Für keinen dieser Erreger konnten bis heute die 'Kochschen Postulate' erfüllt werden, sodaß also ein Kausalbeweis für die Virusätiologie noch aussteht. Aufgrund der Verbreitung bestimmter Infektionskrankheiten muß schon nach den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß Patienten mit Multipler Sklerose irgendwann einmal eine derartige Infektion durchgemacht haben und entsprechende Antikörper besitzen, ohne daß daraus ein kausaler Zusammenhang zur M.S. abzuleiten wäre. Sehr häufig wurde dabei die Korrelation zwischen Masern-Antikörpern und Multipler Sklerose untersucht (Brody et al.1972, Cendrowski et al.1976, Hutchinson et al.1976, Norrby 1978). Jedoch konnten auch hier keine klaren Aussagen erreicht werden.
Ein elektronenoptischer Nachweis von Viren zur Erfüllung der 'Kochschen Postulate' gestaltete sich ebenfalls äußerst schwierig im Zusammenhang mit der Multiplen Sklerose. Zunächst wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Gehirne von M.S. Patienten auf virusähnliche oder zumindest ungewöhnliche Strukturen untersucht. Das Ergebnis waren eine Reihe von Arbeiten aus allen Teilen der Welt, in denen elektronenmikroskopisch verschiedene Viruspartikel bzw. Virusteile in Gehirnschnitten gefunden wurden. Es wird über Paramyxovirus-Strukturen berichtet (Prineas 1972, Watanabe et al.1973, Lampert et al.1975, Tanaka et al.1976a), sowie über Corona-Virus ähn-

liche Partikel (Tanaka et al.1976) und Papova-Viren (Meinke et al.1976). Inwieweit es sich dabei jeweils wirklich um virale Strukturen handelt, und ob diese in Zusammenhang mit der Multiplen Sklerose auftreten, konnte nicht geklärt werden. Inzwischen deutet einiges darauf hin, daß die beobachteten Strukturen auch in Gehirnen von Kontroll-Personen ohne neurologische Defekte anzutreffen sind (Kirk et al.1978).

1.1.5. Virusisolationen aus Geweben von M.S.-Patienten

Ein ebenso unklares Bild ergibt sich hinsichtlich der Isolationen von intakten Viren aus Geweben von M.S.-Patienten: Es wurde zwar bereits 1946 in der Sowjet-Union über eine geglückte Virusisolation berichtet (Margulis et al.1946), doch, wie sich später herausstellte, handelte es sich dabei um Rabies-Viren, für die von anderen Autoren kein Zusammenhang mit der M.S. gefunden wurde (Dick et al.1958). Ähnlich erging es auch einer Isolation von Herpes-ähnlichen Partikeln aus Patienten-Material (Gudoadóttir 1964). Auch hier zeigte sich eine weite Verbreitung von Antikörpern in Kontrollpersonen und keine Korrelation zur Multiplen Sklerose. Es folgten die Berichte über die Erkrankung eines Schafes an Scrapie nach Inokulation von M.S.-Material (Field et al.1962), aber auch diese Ergebnisse waren nicht zu wiederholen (Gibbs 1969). Für R.I.Carp war die Verminderung der in Mäusen zirkulierenden polymorphonucleären Zellen nach Inokulation der Tiere mit Zellmaterial von M.S.-Patienten bzw. mit Scrapie-infiziertem Gewebe ein Hinweis für einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Krankheiten. Er konnte dieses Phänomen mit einem zellfreien Extrakt auf gesunde Mäuse übertragen und die Größe des auslösenden Agens durch Filtration bestimmen (Carp et al.1972). Aber auch diese Befunde konnten von anderen Autoren nur zum Teil reproduziert werden (Brown et al.1974). Trotzdem schien 1976 ein neuer Kandidat für die Virus-Ätiologie der M.S. gefunden zu sein. Aufbauend auf den Arbeiten von Carp et al. und seinen Nachweistechniken hatten G.Henle

und U.Koldowsky das MSAA, das Multiple Sklerose Assoziierte Agens, wieder entdeckt (Henle et al.1975, Koldowsky et al. 1975). Aus Gewebe von Patienten, die sich in akuten Krankheitsstadien befanden, konnte ein Filtrat gewonnen werden, das in übertragbarer Form die Konzentration von polymorphonucleären Leukozyten in Mäusen herabsetzen konnte. Aber auch diese Ergebnisse konnten trotz Verwendung von Original-Gewebe von anderen Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden (Madden et al.1978).
Als neueste Hypothese wird wieder ein Zusammenhang zwischen Herpes-Viren und der Multiplen Sklerose angenommen (Koprowski et al.1978).
Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Isolaten, deren Existenz meistens nur indirekt, d.h. durch korrespondierende Antikörper bzw. durch Effekte an Versuchstieren gezeigt werden konnte, gelang es V.ter Meulen und Mitarbeitern 1972 ein infektiöses Virus aus Gehirnen von zwei an Multipler Sklerose verstorbenen Patienten zu isolieren (ter Meulen et al.1972). Dieses Virus mit der Bezeichnung 6/94 ist ein neuer Vertreter der Parainfluenza-Gruppe. Allerdings konnte auch für das 6/94 Virus ein kausaler Zusammenhang mit der M.S. bisher nicht nachgewiesen werden; denn es gelangen weder weitere Virusisolationen aus Patientengewebe noch konnten 6/94 spezifische Antikörper immer und in hoher Konzentration bei M.S.-Patienten nachgewiesen werden (Barbosa et al.1973, Nemo et al.1974).

Insofern scheint auch mit diesem Virus unter Zugrundelegung der 'Kochschen Postulate' der Erreger der Multiplen Sklerose, soweit überhaupt ein solcher existiert, wieder nicht gefunden zu sein. Bei Betrachtung dieses Tatbestandes stellt sich dann die Frage, ob der bisher eingeschlagene Weg, mit Methoden der 'klassischen Virologie' einen viralen Auslöser für die M.S. zu suchen, überhaupt zum Ziel führen kann; oder sollten erst geänderte Betrachtungsweisen und neue Nachweismethoden erforderlich sein, um bei der Erforschung der Ätiologie von degenerativen Nervenerkrankungen des Menschen entscheidend weiterzukommen?
Aus einem anderen Bereich der animalen Virologie, nämlich dem

der RNA-Tumorviren, ist bekannt, daß sich Viren nicht nur als infektiöse Einheiten durch den Befall von Zellen vermehren können. Vielmehr sind sie in der Lage, sich in einer Form von perfektem Parasitismus auf molekularer Ebene in ihrer Wirtszelle festzusetzen und von dieser auf gewisse Signale hin vermehrt zu werden. Daß heißt, diese Viren erhalten sich in ihren Wirtszellen, ohne daß man sie mit Methoden der 'klassischen Virologie' im Sinne der 'Kochschen Postulate' nachweisen kann. Bei den RNA-Tumorviren kann der virale Anteil in den befallenen Zellen bis auf die virale Nucleinsäure-Information reduziert sein; somit versagen alle serologischen und immunologischen Nachweistechniken, die von virusspezifischen Proteinen abhängig sind.
Auch im Fall der M.S. könnte man sich einen viralen Erreger mit ähnlichen Eigenschaften vorstellen. Wenn von einem solchen Virus nur die Nucleinsäure in der Wirtszelle vorhanden ist und diese nur unter bestimmten Bedingungen abgelesen wird, könnten damit auch die bisher unverstandenen Phänomene wie jahrelange Latenzzeit, unsicherer Antikörpernachweis und die vergebliche Isolierung eines infektiösen Agens erklärt werden.

Diese Überlegungen gelten nicht nur für die M.S., sondern auch für eine Reihe weiterer degenerativer Nervenerkrankungen wie Subakute Sklerotische Panencephalitis, Progressive Multifokale Leukoencephalopathie u.a.,die mit der M.S. viele typische Verlaufseigenschaften gemeinsam haben.
Bei allen diesen Erkrankungen könnte es sich, bedingt durch die zeitweise symptomlose Lagerung der Viren bzw. ihrer Nucleinsäuren in den Zellen, um einen neuen Typ der'viralen Persistenz' handeln. Folgt man hierbei der Definition von Gajdusek, so muß man genauer von einer 'latenten Infektion' sprechen: Dabei ist das Virus in Geweben nicht nachweisbar und zirkuliert auch nicht humoral; stattdessen liegt es in einer inkompletten, defektiven, maskierten Form in den Zellen vor. Nur äußere Einflüsse wie Strahlung etc. und Helferviren können es wieder in den infektiösen, vermehrungsfähigen Zustand zurückführen, in dem es dann auch die Symptome einer Erkrankung hervorruft (Gajdusek et al.1965).

Insofern stellt sich in erster Linie die Frage nach dem Antagonismus zwischen Virus und Zelle und damit nach dem Prinzip der latenten Virusinfektion, bevor die Zuordnung einzelner Virusarten zu bestimmten Krankheiten erfolgen kann. Es muß also zunächst geklärt werden, ob und in welcher Form animale Viren auf molekularbiologischer Ebene in Zellen persistieren können.
In wieweit dabei das bereits kurz erwähnte Paramyxovirus 6/94 als Modellsystem dienen kann, soll im nun folgenden Teil der Einleitung untersucht werden.

1.2. Spezieller Teil: Das 6/94 Virus

1.2.1. Isolierung des 6/94 Virus aus Gehirnzellen von M.S.-Patienten

Auf der Suche nach einem viralen Erreger als Auslöser der Multiplen Sklerose wurden 1972 von Volker ter Meulen und Mitarbeitern die Gehirne von zwei an M.S. verstorbenen Patientinnen untersucht. 2-3 Stunden nach deren Tod wurden durch eine Autopsie die Gehirne steril entnommen (Bauer et al.1975). Eine histologische Untersuchung ergab in beiden Fällen die für die Multiple Sklerose charakteristischen pathologischen Befunde. Anschließend wurde das Gewebe mit Fluoreszenz-markierten Hyperimmunseren auf verschiedene Viren der Paramyxogruppe, nämlich auf Masern, SSPE, Parainfluenza Typ 1-5, Mumps sowie auf Herpes-Viren getestet. Diese Versuche verliefen alle negativ. Ebenso erfolglos verlief die elektronenmikroskopische Suche nach viralen Strukturen in verschiedenen Gehirnbezirken sowie der Versuch, direkt mit Gehirn-Zellhomogenaten CV-1 Zellen bzw. humane diploide Zellen zu infizieren (ter Meulen et al.1972).
Parallel dazu wurden unmittelbar nach der Autopsie Gewebeproben aus verschiedenen Bereichen der Gehirne entnommen. Diese Proben stammten aus den direkt an die Entzündungsherde (Plaques) angrenzenden Bezirken und aus der weiteren Umgebung in der weißen Gehirnsubstanz; auch aus Regionen der grauen Substanz wurden Proben entnommen. Alle Gewebeproben wurden 6-fach geteilt in Kulturflaschen mit Nährmedium überführt. Nach Erreichen eines Monolayers wurden die Zellen passagiert. Ab der 3.Passage zeigten sich bei einigen Kulturen, die sich von Gewebe aus den Plaque-angrenzenden Bereichen herleiten, morphologische Veränderungen in Form von Riesenzellenbildung bei rund 0,5% der Zellen. Ebenso waren ab der 11.Passage bei diesen Zellen vereinzelt Nucleocapsid-ähnliche Strukturen im Zytoplasma zu beobachten. Dagegen konnten keine virusspezifischen Antigene durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden und auch die Hämadsorption mit Erythrozyten zeigte negative Resul-

tate (Koprowski et al.1975, ter Meulen et al.1972).
In der fünften bzw. zehnten Passage nach Kultivierung der Gewebe wurde dann eine Zell-Fusionierung mit CV-1 Zellen und humanen diploiden Zellen durchgeführt. Dies geschah in der Hoffnung, daß eventuell vorhandene unvollständige Viren dadurch freigesetzt werden könnten. Ein Hinweis auf Viren hatte sich ja bereits durch die Elektronenmikroskopie der kultivierten Gehirnzellen in Form von Nucleocapsid-ähnlichen Strukturen ergeben. Als bewährter Fusionsfaktor wurde inaktiviertes Sendai-Virus eingesetzt (Knowles et al.1968); das dabei verwendete Virus (Sendai HVJ-Stamm) stammte aus dem Wistar-Institut (Philadelphia, USA) und war bereits dort mit 2-Propiolakton inaktiviert worden, bevor es nach Überprüfung auf intakte Viruspartikel für die Fusionierungsexperimente nach Deutschland geschickt wurde (Koprowski et al.1975). Dieses Verfahren sollte die Beeinflussung späterer Ergebnisse durch Kontamination mit intaktem Sendai Virus ausschließen. Zusätzlich wurde alternativ auch Lysolecithin für die Fusionierung verwendet (Croce et al.1971). Die Zellen wurden dann bei 37°C weiterinkubiert bzw. bei Bedarf subkultiviert.

Die mit inaktiviertem Sendai Virus behandelten Zellen zeigten nach der Fusionierung innerhalb von vier Monaten keinerlei ungewöhnliche Veränderungen in ihrer Morphologie und es wurde auch kein Virus freigesetzt.
Im Gegensatz dazu änderten die mit Lysolecithin fusionierten Zellen gleich nach der ersten Subkultur deutlich ihr Aussehen und die Mitoserate stieg gegenüber Kontrollzellen an. Nach der neunten Passage war die Mitoserate noch weiter erhöht, die Zellen verloren die Kontakthemmung und waren ab diesem Zeitpunkt als permanente Zell-Linie anzusehen.
Parallel dazu wurden die Zellen elektronenoptisch auf virusspezifische Strukturen untersucht. Nucleocapside wurden bald nach der Fusionierung im Zellkern, später nur noch im Zytoplasma gefunden; die Zahl dieser Strukturen nahm im Lauf der Subkultivierungen zu. Ab der vierten Passage waren auch Ausschleusungsprozesse von Viren (Budding) nachweisbar (Iwasaki et al. 1973).

Ab der dritten Subkultivierung nach Fusionierung erbrachte auch die Hämadsorption mit humanen O- bzw. Meerschweinchen-Erythrozyten positive Resultate. Es konnte eine positive Korrelation aufgestellt werden zwischen Hämadsorptions-positiven Zellen und solchen, die elektronenoptisch nachweisbar Nucleocapside enthielten. Es zeigte sich ein wesentlich höherer Prozentsatz von HAD-positiven Zellen bei Inkubationstemperaturen von 33°C gegenüber den Standardbedingungen bei 37°C.

Durch Kontroll-Fusionierungen nur mit CV-1 Zellen bzw. mit CV-1 Zellen und Zellen von Patienten mit anderen Krankheiten (darunter auch Jacob-Creutzfeldt's disease) wurde sichergestellt, daß die freigesetzten Viren ihren Ursprung in den Zellen der M.S.-Patienten haben und nicht in den Affennieren-Zellen (CV-1). Diese Aussage wurde noch unterstützt durch die Tatsache, daß aus allen Gewebeproben sich nur drei Proben aus dem Plaque-angrenzenden Bereich als Virus-positiv erwiesen. Im Fall einer Laborkontamination mit dem Sendai Virus wäre ein größerer Prozentsatz von virusproduzierenden Kulturen zu erwarten gewesen. Außerdem zeigten nur diejenigen Zellkulturen eine Virusproduktion, die mit Lysolecithin fusioniert waren, nicht dagegen die mit inaktiviertem Sendai-HVJ behandelten.

Daraus geht hervor, daß es sich bei dem isolierten Virus weder um eine Laborkontamination, noch um ein in den CV-1 Zellen persistierendes Virus handeln kann. Eine weitere Bestätigung dieser Aussage erbringt die serologische Charakterisierung des 6/94 Virus.

1.2.2. Klassifizierung des 6/94 Virus

Erste Hinweise zur Identifizierung dieses neuen viralen Agens, welches die Bezeichnung 6/94 erhielt, ergaben sich durch Hemmung der Hämadsorption mittels Immunseren gegen Parainfluenza-1 Viren. Dagegen war mit Antikörpern gegen Masern-, Mumps- oder Parainfluenza-Viren der Serotypen 2-5 keine Blockierung dieser Reaktion zu beobachten.

Zur genauen Typisierung wurde das 6/94 Virus zunächst in embryonierten Hühnereiern vermehrt. Anschließend wurde es durch verschiedene serologische Tests mit anderen Viren des Parainfluenza-1 Serotyps verglichen, nämlich mit den mäusepathogenen Sendai-Stämmen "MN" und "Z", sowie mit den humanpathogenen Sendai-Stämmen "HVJ", "Obayashi" und "Fushimi" (= Sendai D 52). Durch den Hämadsorptions-Hemmungstest (HAH-Test), die Komplement-Bindungsreaktion und den Neutralisations-Test zeigten sich nur signifikante Unterschiede zum HA-2 Virus (= Sendai HVJ); d.h. zu dem Virus, das nach Inaktivierung ebenfalls als Fusionsfaktor eingesetzt wurde, ohne jedoch die Freisetzung des 6/94 aus den Zellkulturen zu ermöglichen. Durch Anwendung des kinetischen HAH-Tests konnte das 6/94 Virus dann von den mäusepathogenen Sendai-Stämmen differenziert werden. Dadurch waren jetzt alle Einwände ausgeräumt, es könne sich bei dem Isolat um eine Laborkontamination handeln (Lief et al.1975).
Die Abgrenzung gegenüber den humanpathogenen Sendai-Typen 'Obayashi' und 'Fushimi' erfolgte durch biologische Tests. So zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Sendai- und 6/94-Virus in der Lokalisation der Nucleocapside in der Zelle, dem Temperatur-Optimum für das Wachstum in Zellen, der Fusionsfähigkeit, der Hämolyse von Hühner-Erythrozyten und den lytischen Eigenschaften bei Infektion von embryonalen Hühner-Fibroblasten (Lewandowski et al.1974).
Weitere Vergleiche mit dem Sendai Virus erstreckten sich auf die virale Nucleinsäure und die Strukturkomponenten. Wie alle Paramyxoviren enthält das 6/94 Virus eine einzelsträngige RNA mit einem MW von $6\text{-}7 \times 10^6$ Dalton und einem s-Wert von 50s verglichen mit ribosomaler RNA aus Eukaryonten. Außerdem kommt RNA mit niedrigem MW vor, die entweder als Degradation oder als Genom RNA von inkompletten Viren anzusehen ist. Im Sedimentationsverhalten unterscheidet sich die 6/94 RNA geringfügig von der der Sendai Viren, jedoch besteht eine Sequenzhomologie zwischen der Sendai-spezifischen 18s RNA in infizierten Zellen und der 6/94 RNA (Kolakowsky et al.1974). Eine ähnlich gute Übereinstimmung besteht in der Polypeptid-Zusar-

mensetzung. Wie die Sendai Viren enthält auch das 6/94 Virus neun unterscheidbare Polypeptide, deren MW abgesehen von geringfügigen Abweichungen übereinstimmt (Lewandowski et al. 1976).
Aus diesen vergleichenden Untersuchungen ergibt sich, daß das 6/94 Virus ein neuer Vertreter des Parainfluenza-1 Serotyps ist. Serologisch besteht mit den humanpathogenen Sendai Stämmen eine nahe Verwandtschaft, während sich in den biologischen Eigenschaften deutliche Unterschiede ergeben. Da die RNA-Sequenz des 6/94 Virus weitgehend mit der RNA der Sendai Viren übereinstimmt, kann man das 6/94 Virus als Mutante des Sendai Virus bezeichnen.
Eine Kontamination mit Sendai Viren bei der Isolierung des 6/94 Virus kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da deutliche antigenetische Unterschiede zwischen beiden bestehen und nur die Fusionierung mit Lysolecithin zur Freisetzung des 6/94 Virus führte. Durch Überprüfung der CV-1 Zellen sowie durch den Tatbestand, daß nicht alle fusionierten Kulturen Viren freisetzten, ist sichergestellt, daß das 6/94 Virus ursprünglich aus den Gehirnzellen der beiden Patientinnen stammt.
In der Folgezeit konnte durch experimentelle Arbeiten gezeigt werden, daß das 6/94 Virus in der Lage ist, Gehirnzellen zu infizieren und in einen latenten Zustand überzugehen.

1.2.3. Infektionen von Zell-Kulturen und Versuchstieren mit dem 6/94 Virus

Nach Infektion von primären humanen Gehirnzellen mit 6/94 Viren sind nach kurzer Zeit keinerlei Virusbestandteile in den Zellen mehr mit serologischen und immunologischen Methoden nachweisbar. Durch anschließende Fusionierung der Zellkulturen mit CV-1 oder WI-38 Zellen kommt es jedoch wieder zur Freisetzung von infektiösen 6/94 Viren. Das Virus kann folglich in den menschlichen Gehirnzellen in einen latenten Status übergehen; im Gegensatz dazu verläuft die Infektion

von primären Rinder-Gehirnzellen mit 6/94 Viren als produktive Infektion, d.h. nach einiger Zeit zeigen fast alle Zellen positive Hämadsorption und Immunfluoreszenz (Wroblewska et al. 1976).
Weiterhin wurde die Aufnahme und Vermehrung des 6/94 Virus durch menschliche Leukozyten in Zellkultur nachgewiesen. Daraus ergab sich die Folgerung, diese Zellen könnten dem Virus als Reservoir und als Vehikel zur Verbreitung im Organismus dienen (Bogen et al.1977). Zu einer ähnlichen Schlußfolgerung führten auch Experimente, bei denen es nach Inokulation von 6/94 Viren in neugeborene ICR-Mäuse zu einer Vermehrung der Viren in zirkulierenden mononuclearen Zellen kommt (Wolinsky et al.1975).
In diesem Zusammenhang sind auch Beobachtungen von Interesse, daß in Zellen gewachsene 6/94 Viren, die für die gleiche Zellart nicht mehr infektiös sind, nach Passage in Macrophagen bzw. durch proteolytische Behandlung wieder in eine infektiöse Form umgewandelt werden (Waters et al.1974). Diese Wiedergewinnung der Infektiosität von zell-gewachsenen Viren ist bereits auch für das Sendai Virus gezeigt worden (Homma 1971).
Weiterhin wurden in Tierversuchen die Folgen von 6/94 Infektionen untersucht. Nach Inokulation von Virus-Material in neugeborene Chimpansen zeigten sich spezifische Antikörper unmittelbar nach der Infektion nur im Serum. 14 Monate später stellte sich ein abnormales EEG ein, begleitet von gelegentlichen Zuckungen der Tiere. Ein Chimpanse wurde nach 23 Monaten getötet. In seiner Cerebrospinal-Flüssigkeit waren kurz vorher 6/94 spezifische Antikörper nachweisbar gewesen. Jedoch war es nicht möglich, aus dem Gehirn des Tieres Viren zu isolieren, obgleich verschiedene pathologische Läsionen zu erkennen waren (Lief et al.1976).
In weiteren Experimenten wurden Säuglingsmäuse direkt nach der Geburt mit 6/94 Virus intracerebral infiziert. Daraufhin starben ein Teil der Tiere bald an einer nekrotischen Panenzephalitis, während 70% überlebten und sich bis auf einige nichtentzündliche Degenerationen in der weißen Hirnsubstanz

normal entwickelten. Diese Tiere wurden nach der Infektion verschiedenen Beobachtungen unterzogen. Dabei zeigte sich eine Abnahme des 6/94 Titers im Gehirn der Mäuse, bis am 10. Tag nach Infektion keine Viren mehr nachweisbar waren; damit gekoppelt war auch ein Rückgang der elektronenoptisch nachweisbaren Budding-Prozesse von reifen Viruspartikeln. Bis zum 35. Tag post infectionem waren Nucleocapside im Cytoplasma der Gehirnzellen nachweisbar. 6/94 spezifische Antikörper im Serum wurden vom 15. bis zum 128. Tag gemessen. Durch Fusionierung der Mäusezellen mit humanen diploiden Zellen konnte 37 Tage nach Infektion wieder eine positive Hämadsorption erreicht werden, die durch Immunfluoreszenz als 6/94 spezifisch bestimmt wurde. Damit war auch in diesem System, ähnlich wie bei den infizierten menschlichen Gehirnzellen, das 6/94 Virus aus dem latenten Zustand in einen aktiven überführt worden (Rorke et al.1976, Gilden et al.1976, Wolinsky et al.1976, Zgorniak-Nowosielska et al.1976).
Ungeachtet eines kausalen Zusammenhanges zwischen der M.S. und dem 6/94 Virus lassen sich die oben erwähnten experimentellen Befunde über den latenten Zustand dieses Virus mit den im allgemeinen Teil der Einleitung aufgeführten empirischen Daten zur Ätiologie der M.S. in ein gemeinsames hypothetisches Konzept einfügen: Im Anschluß an die Infektion mit dem viralen Agens kommt es in bestimmten Zielzellen zu einer Umwandlung des Virus in die latente Form. In diesem Zustand verharrt das Virus lange Zeit, vom Organismus und seinen Abwehrsystemen unbemerkt. Auf einen bestimmten Reiz hin (im Experiment durch Zellfusionierung) wird das latente Virus dann in die infektiöse Form zurückverwandelt; die einsetzende Virusvermehrung und die damit verbundene Veränderung der Wirtszellen führt dann zu den typischen Krankheitssymptomen.

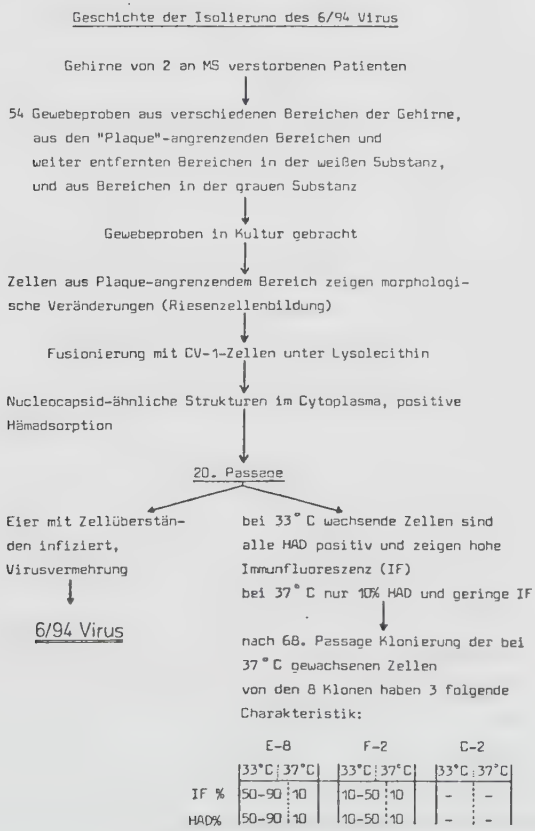
Dieses Konzept einer Auslösung menschlicher degenerativer Nervenkrankheiten durch Aktivierung eines latenten Virus konnte bis heute noch für keine Erkrankung bewiesen werden. Als Hauptgrund dafür muß man die bereits erwähnten Schwierigkeiten ansehen, aus Patienten mit Krankheiten wie z.B. Multipler Sklerose, infektiöse Viren zu isolieren.

Insofern stellt die Isolierung des 6/94 Virus durch die Gruppe von V. ter Meulen einen ersten wichtigen Schritt in dieser Richtung dar. Wenn auch das 6/94 Virus wahrscheinlich nicht generell auslösendes Agens für die M.S. ist, so können doch anhand der isolierten Gehirnzellen und des daraus freigesetzten Virus Untersuchungen über den Zustand eines latenten Virus in seiner Wirtszelle begonnen werden.
Die genaue Untersuchung der fusionierten Gehirnzellen erscheint auch deshalb besonders interessant, weil aus einunderselben Gewebeprobe sowohl virusproduzierende als auch nicht produzierende Zellen isoliert werden konnten. Die Untersuchung von drei der Fusionszell-Klone steht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit; im folgenden Abschnitt soll deshalb die Isolierung und Charakterisierung dieser Zellklone ausführlich beschrieben werden.

1.2.4. Klonierung der fusionierten Gehirnzellen

Bereits nach ihrer Isolierung zeigten ein Teil der in Kultur gebrachten Nervengewebe-Proben aus den Gehirnen der beiden M.S.-Patientinnen morphologische Veränderungen und vereinzelt Nucleocapsid-ähnliche Strukturen; hingegen verliefen Tests auf infektiöse Viren negativ. Im Anschluß an die Fusionierung konnten dann vermehrt Nucleocapside nachgewiesen werden; die bei 33°C wachsenden Zellen ergaben fast vollständig positive Hämadsorption, dagegen war dieser Test bei Zellen, die mit 37°C inkubiert wurden, nur zu 10% positiv. Die Resultate der Hämadsorption konnten mit einem Immunfluoreszenztest mit Antikörpern gegen Parainfluenza-Viren korreliert werden.
In der 68. Passage ab Fusionierung wurden Zellen, die von einer Gewebeprobe aus dem Plaque-angrenzenden Bereich abstammten, kloniert. Von den acht entstandenen Zellklonen waren sieben im HAD-Test bzw. in der Immunfluoreszenz positiv, wobei auch wieder der Temperatureffekt zu beobachten war. Lediglich ein Klon war unabhängig von der Temperatur bei den Tests absolut negativ (Koprowski et al.1975).

Von diesen acht Zell-Klonen sind drei ausgewählt und in der vorliegenden Arbeit molekularbiologisch untersucht worden: Es handelt sich dabei um den Klon 'Cl-E-8' mit überwiegend positiver Hämadsorption bzw. Immunfluoreszenz, den Klon 'Cl-F-2', der wesentlich weniger virusinfizierte Zellen enthält, sowie um den Klon 'Cl-C-2', der sich in beiden Tests vollständig negativ verhält. Zusammenfassend sind in der Tabelle 1 die wichtigsten Isolierungsdaten des 6/94 Virus zusammen mit den Charakteristika der drei ausgewählten Klone wiedergegeben.



Tab. 1: Daten zur Isolierung des 6/94 Virus und der drei Fusionszellklone

Bei der Auswahl dieser Klone wurde von folgender Überlegung ausgegangen: Wenn bei degenerativen Erkrankungen des ZNS, wie z.B. bei der Multiplen Sklerose, die virale Persistenz durch virusspezifische Nucleinsäuren erfolgt, müßten sich diese durch geeignete Verfahren nachweisen lassen. Im Fall des HAD- und Immunfluoreszenz-positiven Klons Cl-E-8, in dessen Mutterzelle nach Fusionierung mit CV-1 Zellen das 6/94 Virus aus dem latenten Zustand in eine infektiöse Form umgewandelt wurde, müßte virusspezifische Nucleinsäure nachweisbar sein. Damit stellen die Cl-E-8 Zellen ein positives Kontrollsystem dar. Für die beiden anderen Zellklone Cl-F-2 und Cl-C-2 ist aufgrund der serologischen und immunologischen Daten ein anderer Nucleinsäurestatus zu erwarten, der die eigentlich wichtigen Aussagen über eine latente Infektion mit Paramyxoviren liefern sollte: Ein Teil der Cl-F-2 Zellen hat ebenfalls 6/94 spezifische Proteine in seiner Zelloberfläche. Dies bedeutet, daß auch bei diesem Klon zumindest bei einigen Zellen eine Umwandlung des latenten 6/94 in eine infektiöse Form erfolgt ist, bzw. daß nur noch ein Teil der Zellen latent infiziert ist. Es müßte sich also hinsichtlich virusspezifischer Nucleinsäuren ein ähnliches Bild wie bei den Cl-E-8 Zellen ergeben; wenn sich jedoch die Nucleinsäuren von latenten und von infektiösen Viren unterscheiden sollten, müßte man mit einem größeren Anteil der für latente Viren spezifischen Nucleinsäure rechnen.

Bei dem dritten ausgewählten Klon Cl-C-2 sollten sich eindeutige Aussagen erzielen lassen. Auch seine Stammzelle leitet sich von der Virus-positiven Gewebeprobe ab, sie sollte folglich latent infiziert sein. Andererseits zeigen die Zellen dieses Klons keinerlei Hämadsorption bzw. spezifische Immunfluoreszenz; daraus kann man schließen, daß das 6/94 Virus in diesen Zellen noch in seiner latenten Form vorliegt und eine entsprechende virusspezifische Nucleinsäure nachzuweisen sein müßte.

Aufgrund der aufgeführten Überlegungen sollten die drei Fusionszell-Klone ein geeignetes Testsystem darstellen, um, ausgehend von den immunologischen und serologischen Befunden,

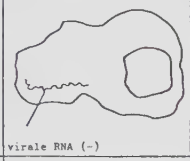
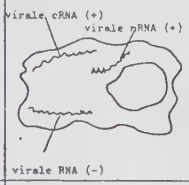
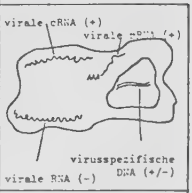
die Frage nach einem auf Nucleinsäure-Niveau in Zellen persistierenden Virus zu untersuchen.
Abschließend soll nun erörtert werden, welche Nucleinsäure-Species bei latenten Paramyxoviren in den Wirtszellen auftreten können und wie man diese nachweisen kann.

1.2.5. Nachweis von latenten Viren

Seit einiger Zeit wird als Nachweisverfahren für versteckte Nucleinsäuren von latenten Viren die Nucleinsäure-Hybridisierungstechnik eingesetzt.
Dieses Verfahren diente schon vielfach dazu, latente RNA-Tumorviren in Zellen nachzuweisen (Schlom et al.1975, Nonoyama et al.1975). Diese Viren schreiben ihre RNA mittels des virusspezifischen Enzyms Reverse Transcriptase in eine basenkomplementäre DNA-Kopie um, die als Pro-Virus DNA in das Zellgenom integriert wird. Durch diesen Prozeß, der zum normalen Replikationsvorgang der Retro-Viren gehört, wird die virale Information in der Zelle dauerhaft gespeichert.

Eine deutlich andere Situation herrscht in mit Paramyxoviren (z.B. 6/94) infizierten Zellen. Als typische 'Negativ Strang' Viren replizieren die Paramyxoviren ihre virale RNA (—Polarität) mit Hilfe einer RNA-Kopie, die basenkomplementär vom virusspezifischen Enzym 'RNA-abhängige RNA Polymerase' synthetisiert wird. Diese cRNA (+ Polarität) dient sowohl als Matrize für die Vermehrung der viralen RNA, als auch nach Poly-Adenylierung als Messenger-RNA für die Synthese der viralen Proteine. In einer mit Paramyxoviren infizierten Zelle sollten also diese virusspezifischen RNAs mit unterschiedlicher Polarität zu finden sein: virale RNA, cRNA und virusspezifische m-RNAs.
Da ein Enzym vom Typ der Reversen Transcriptase der RNA-Tumorviren bis heute bei den Paramyxoviren nicht nachgewiesen werden konnte, schienen für die virale Persistenz auf Nucleinsäureebene bei diesen Viren nur die in der infizierten Zelle anzutreffenden RNA-Species in Frage zu kommen.

Diese Annahme mußte jedoch durch die Ergebnisse von Arbeiten, die in den letzten vier Jahren veröffentlicht wurden, entscheidend erweitert werden. Die Arbeitsgruppen von Simpson in den U.S.A. sowie von Zhdanov in der U.S.S.R. fanden heraus, daß nach chronischer Infektion von verschiedenen Zell-Linien mit RNA-Viren aus der Paramyxo- bzw. Arbo-Virusgruppe auch virusspezifische DNA-Sequenzen in den Wirtszellen nachweisbar sind; diese Beobachtung ist von großer Bedeutung, da bisher bei der Replikation dieser Viren DNA-Zwischenstufen unbekannt waren (Zhdanov et al.1974a, Simpson et al.1975). Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, daß es sich um einen neuen Mechanismus für die virale Persistenz handeln könnte und überprüften die Resultate an weiteren Virus-Zell-Systemen. Dabei wurden hauptsächlich Viren der Paramyxogruppe untersucht, nämlich das Respiratory Syncytial Virus (Simpson et al.1975), das Masern Virus (Zhdanov et al. 1974c), das Sendai- und Newcastle Disease Virus (Zhdanov et al.1976) und das SV-5 Virus (Zhdanov et al.1977), aber auch zwei Vertreter der Arbo-Viren, nämlich das Tick-Borne-Encephalitis Virus (Zhdanov et al.1974b), und das Sindbis Virus (Zhdanov et al.1977). In allen diesen Fällen konnten in chronisch infizierten Zellen virusspezifische DNA-Sequenzen nachgewiesen werden.
Aufgrund der genannten Ergebnisse muß nun auch für die Untersuchung der drei Fusionszell-Klone auf latente 6/94 Viren der Nachweis von virusspezifischen Nucleinsäuren um mögliche DNA-Sequenzen erweitert werden. Es sind somit folgende 6/94 spezifischen Nucleinsäuren in den Zellen denkbar: 1) die'normalen' virusspezifischen RNA-Species, nämlich 6/94 virale RNA, 6/94 cRNA und virusspezifische Messenger RNAs. 2) virusspezifische DNA-Sequenzen, die analog zu den von Zhdanov und Mitarbeitern gefundenen proviralen DNA-Sequenzen von einem noch unbekannten Enzymsystem transcribiert worden sind.
Zum Nachweis dieser verschiedenen virusspezifischen Nucleinsäuren wurde als einheitliche Methode die Nucleinsäurehybridisierung eingesetzt. Aus technischen Gründen wurde dabei jeweils RNA mit spezifischen DNA-Proben und umgekehrt hybridisiert. Die experimentellen Vorteile, die sich bei der Analyse

	"Provirale DNA" latent infizierte Zelle	virusproduzierende Zelle	"Provirale DNA" latent infizierte Zelle	virusproduzierende Zelle
				
virus-spezifische Nucleinsäuren in der Zelle	virale RNA (-)	virale RNA (-) virale cRNA (+) virale mRNA (+)	virusspezifische DNA (+/-)	virusspezifische DNA (+/-) virale RNA (-) virale cRNA (+) virale mRNA (+)
Nachweis möglich durch	6/94 cDNA (+)	6/94 cDNA (+) 6/94 cDNA (-)	6/94 RNA (+/-)	6/94 RNA (+/-) 6/94 cDNA (+) 6/94 cDNA (-)

Tab. 2: Virusspezifische Nucleinsäuren und deren Nachweismöglichkeiten in mit Paramyxoviren latent oder produktiv infizierten Modellzellen.

von RNA/DNA Hybriden gegenüber DNA/DNA und RNA/RNA Hybriden ergeben, werden im Ergebnisteil noch ausführlich diskutiert. Aus diesem Konzept folgte zwangsläufig, daß zwei 6/94 spezifische Nachweisproben erforderlich wurden, nämlich 6/94 DNA und 6/94 RNA. Letztere wurde in Anlehnung an die virologischen Standardmethoden durch Virusvermehrung und Markierung in Zellkulturen hergestellt. Für die Synthese von 6/94 spezifischer DNA wurde hingegen ein neuer Weg beschritten: Analog zur Reversen Transcription der RNA-Tumorviren wurde in einem in-vitro System, unter ähnlichen Bedingungen wie sie für die Retroviren publiziert sind (Rothenberg et al.1976, Verma et al.1978), eine basenkomplementäre 6/94 cDNA synthetisiert. Die Voraussetzungen dazu waren bereits in einer früheren Arbeit geschaffen worden, in der die Reaktionsbedingungen eingehend studiert worden waren und auch nachgewiesen werden konnte, daß es sich bei der 6/94 cDNA um eine virusspezifische Probe handelt (Neubert 1976). Somit standen für die Hybridisierungsexperimente die erforderlichen virusspezifischen Proben zur Verfügung.

Die verschiedenen in den Fusionszellen zu erwartenden virus-

spezifischen Nucleinsäuren sowie die entsprechenden Nachweisproben sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.
Durch die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollte sich ein zusammenhängendes Bild über die 6/94 spezifischen Nucleinsäuren in den drei Fusionszell-Klonen erstellen lassen. Damit müßte zugleich eine Aussage zu erreichen sein, in welcher Form das 6/94 Virus in seinen Wirtszellen persistiert. Da es sich bei den Zellklonen um Isolate aus Patienten-Gewebe handelt, bei denen das latente Virus auf 'natürlichem' Weg in die Zellen gelangt ist, muß die Aussage dieser Experimente über einen Zusammenhang zwischen degenerativen Nervenerkrankungen und latenten Virusinfektionen höher bewertet werden als bei vergleichbaren Versuchen mit experimentell infizierten Zellen.

Auch wenn durch die vorliegende Arbeit der Nachweis einer direkten Kausalität zwischen dem 6/94 Virus und der Multiplen Sklerose nicht zu erwarten ist, so kann doch die Hypothese einer viralen Ätiologie der degenerativen Erkrankungen des ZNS durch den hier gewählten experimentellen Ansatz erneut entscheidend gestützt werden.

PROBLEMSTELLUNG

Latente Infektionen von Zellen durch Viren werden heute vielfach als Auslöser für Krankheiten von bisher ungeklärter Ätiologie angesehen. Versuche verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß u.a. Paramyxoviren in Zellkulturen in Form von Nucleinsäuren persistieren können. Durch die Isolierung des neuen Paramyxovirus 6/94 aus Gehirnzellen von M.S.-Patientinnen ist die Voraussetzung geschaffen worden, die Hypothese einer Beteiligung von latenten Viren an degenerativen Nervenerkrankungen an einem 'natürlichen' Modellsystem zu überprüfen. Dabei soll an drei aus dem Gehirngewebe isolierten Zellklonen, die sich nach immunologischen und serologischen Kriterien im Auftreten von virusspezifischen Proteinen und damit in ihrer Virusproduktion unterscheiden, der molekulare Mechanismus der viralen Persistenz durch das 6/94 Virus untersucht werden.

Folgende Fragen sollen an diesem System geklärt werden:

1) Ist in jedem der drei ausgewählten Zellklone virusspezifische RNA mit Hilfe der in-vitro synthetisierten cDNA nachweisbar?
2) Lassen sich durch direkte Markierung der viralen RNA in den Zellen noch andere RNA-Spezies nachweisen, die durch Hybridisierung mit der cDNA nicht erkennbar sind?
3) Sind in den Gehirnzell-Klonen weitere virusspezifische Nucleinsäuren enthalten, die nicht während des 'normalen' Replikationsvorganges der Paramyxoviren auftreten, wie sie z.B. in Form von DNA bei chronisch infizierten Zellkulturen nachgewiesen werden konnten?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.0. Material

6/94-haltige Allantoisflüssigkeit aus Hühnereiern wurde von Prof.V.ter Meulen (Würzburg) zur Verfügung gestellt.
Die drei Fusionszell-Linien C1-C-2, C1-E-8 und C1-F-2 stammten von Prof.H.Koprowski (Philadelphia, USA), (Koprowski et al. 1975).
AMV-haltiges Hühnerplasma zur Isolation von Reverser Transcriptase stellte Prof.J.Beard (St.Petersburg, USA) zur Verfügung.
S1-Nuclease aus Aspergillus oryzae war ein Geschenk von Dr. Bob van Dorp, DNA-abhängige RNA Polymerase aus E.coli war ein Geschenk von Dr.P.Palm, Martinsried.
Von der Fa.Boehringer,(Tutzing) wurden folgende Biochemikalien und Enzyme bezogen: Alle unmarkierten Desoxiribonucleosid- und Ribonucleosid-Triphosphate, Ribonuclease A, Pronase.
Alle Feinchemikalien, auch Cs_2SO_4 'Suprapur', stammten von der Fa.Merck (Darmstadt);-RNase-freie Sucrose von Schwarz-Mann, -DNase I und RNase A von Worthington, -Act.D von Sigma, -Oligonucleotide, wie oligo dG, von PL-Biochemicals (Milwaukee, USA), -befruchtete, virusfreie Hühnereier (SPAFA-eggs) von der Fa.Lohmann (Cuxhaven),-alle radioaktiv markierten Desoxi- und Ribonucleosid-Triphosphate und Ribonucleoside von Amersham-Buchler (Braunschweig), Ultrafiltrations-Membranen wurden von der Fa.Amicon (Witten) bezogen.
In der Zellkultur wurden Kulturgefäße von Schott (Mainz), Falcon (Cockeysville, USA) und Costar (Cambridge, USA) verwendet. MEM-F 15 Pulvermedium stammte von Gibco (England), phosphatfreies MEM-F 15 von Laborservice (München), die Antibiotika Streptomycin-Sulphat von Horm-Chemie (München) und Penicillin G von Hoechst (Frankfurt); fötales Kälberserum lieferte Flow-Laboratories (Bonn).
Die serologischen Tests wurden in Mikrotiterplatten der Fa. Nunc (Dänemark) durchgeführt, die Kontrollseren bzw. -Antigene stammten von den Behring-Werken (Marburg). Das benötigte

human-0-Blut stellte das Klinikum München-Großhadern zur Verfügung.
Die Desinfektionsmittel Desderman und Grotanat wurden bei Schülke&Mayr (Norderstedt) gekauft, Lorasol V bei TAD (Cuxhaven).
Für statistische Berechnungen wurden Rechnerprogramme der Fa. Hewlett-Packard (Frankfurt) verwendet.

2.0.0. Puffer und Lösungen

1) Pbs⁻-Puffer

8,00	gr.	NaCl
1,15	gr.	Na_2HPO_4
0,20	gr.	KH_2PO_4
ad 1000	ml	H_2O

2) STE-Puffer

0,1	M	NaCl
0,01	M	Tris-HCl pH 8
0,001	M	EDTA

3) SSC-Puffer

0,15	M	NaCl
0,015	M	Na-citrat (mit NaOH auf pH 7)

4) Lysopuffer

10	mM	KCl
1,5	mM	Mg-acetat
10	mM	Tris-HCl pH 7,5
1	mM	DTE

5) Puffer "Z" (10-fach)

200	mM	Hepes (mit NaOH auf pH 7,5)
500	mM	K-acetat
30	mM	Mg-acetat
10	mM	DTE

6) Hybridisierungspuffer (10-fach)

4	M	NaCl
20	mM	EDTA
100	mM	Tris-HCl pH 7,4

7) Standardmix (SDM) für Reverse Transcription (10-fach)

50	mM	Mg-acetat
900	mM	KCl
100	mM	DTE
500	mM	Tris-HCl pH 8,3
10	mM	ATP pH 7,0

8) Nuclease S1-Puffer

30	mM	Na-acetat pH 4,6
50	mM	NaCl
1	mM	$ZnSO_4$
5	%	Glyzerin

9) Hochsalzpuffer für oligo-dT Säule

500	mM	NaCl
10	mM	Tris-HCl pH 7,6
0,1	%	SDS

10) Niedrigsalz-Puffer für oligo-dT Säule

10	mM	Tris-HCl pH 7,6
0,1	%	SDS

11) Toluol-Szintillator

5	gr.	2,5-Diphenyloxazol
0,3	gr.	2,2-Phenylen-bis-(4Methyl)-5-Phenyloxazol
ad 1000	ml	Toluol

12) Standardmix für cRNA Synthese (4-fach)

120	mM	Tris-HCl pH 7,8
120	mM	KCL
40	mM	$MnCl_2$
2	mM	DTE
2	mM	EDTA

2.1. Virusvermehrung

Zur Vermehrung der 6/94 Viren wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet.

2.1.1. Virusvermehrung in Zellkultur

Paramyxoviren werden aus ihrer Wirtszelle durch einen Ausschleusungsvorgang freigesetzt, bei dem die Zelle nicht zerstört wird. Dieser "Budding"-Prozeß konnte auch beim 6/94 Virus elektronenmikroskopisch gezeigt werden (Iwasaki et al. 1973). Es eröffnet sich damit die Möglichkeit, 6/94 Viren kontinuierlich aus Zellkulturen zu gewinnen.
Als Ausgangsmaterial dienten die von H.Koprowski überlassenen Zellklone Cl-E-8 und Cl-F-2, die beide Viren produzieren und deren Herkunft in der Einleitung näher beschrieben ist. Die Cl-E-8 Zellen befanden sich in der 108. Passage seit der Isolierung, die Cl-F-2 Zellen in der 115. Passage. Als Wachstumsmedium für diese Zellen eignet sich das Minimal Essential Medium (MEM) in der F 15 Modifikation, die einige zusätzliche Aminosäuren enthält. Außerdem werden dem Medium 10% fötales Kälberserum, je 100 i.E.Streptomycin und Penicillin und Phenolrot als pH-Indikator zugesetzt. Die Zellen werden in Kunststoff - Roux Flaschen (150 cm^2 Nutzfläche) bei 33°C und 5% CO_2 in einem Brutschrank gezogen. Nach Erreichen eines geschlossenen Zellrasens wäscht man die Zellen mit 0,25%iger Trypsin-Lösung, anschließend wird neues Trypsin zugegeben. Nach einer Einwirkzeit von 1-5 min. lösen sich die Zellen von der Kulturflasche ab; zum besseren Vereinzeln werden sie mit Medium durchpipettiert. Dann werden die Zellen in neue Kulturflaschen überführt. Dabei sollte ein Verdünnungsfaktor von 10 nicht überschritten werden.
Für die Virusisolation wird das Kulturmedium, in das die Viren von den Zellen ausgeschieden werden, bei jedem Mediumwechsel bzw. vor jeder Trypsinierung gesammelt. Zunächst muß es niedertourig abzentrifugiert werden, um Zellen und Zell-

trümmer zu entfernen. Den Überstand pipettiert man vorsichtig ab und lagert ihn eingefroren bei -20°C bis zur Virusreinigung. Um die Virusproduktion zu steigern, wurden die Zellen in Roller-Kulturflaschen gezüchtet. Bei diesem Verfahren können bei gleicher Menge Kulturmedium 4-6 mal mehr Zellen wachsen als in Roux-Flaschen. Die langsame Rotation der Rollerflaschen von 30-60 Umdrehungen pro Stunde gewährleistet einen intensiven Gas- und Nährstoffaustausch für die Zellen. Rollerkulturen können mehrere Wochen überleben, wenn die erforderlichen Mediumwechsel durchgeführt werden. Aufgrund des günstigeren Verhältnisses zwischen Zellzahl und Nährstoffvolumen ergeben sich deutlich bessere Virusausbeuten gegenüber Kulturen in Roux-Flaschen. Die virushaltigen Zellüberstände werden ebenfalls nach niedertouriger Zentrifugation bei -20°C eingefroren gesammelt.

Um Veränderungen der Zellen im Laufe vieler aufeinanderfolgender Passagen zu vermeiden, wurden zu Beginn der Zellzüchtung Stammröhrchen angelegt. Dazu wurden die Zellen in Kulturmedium mit Zusatz von 10% DMSO nach dem üblichen Verfahren eingefroren (Mayr et al.1974) und bei -120°C gelagert. So konnte man jeweils nach Ablauf von maximal 30 Passagen auf ein Stammröhrchen zurückgreifen. Zum Auftauen werden die Zellen dann möglichst rasch auf 37°C erwärmt und nach Entfernen des Einfriermediums mit neuem Kulturmedium in Roux-Flaschen eingesät.

Weiterhin wurden Untersuchungen bezüglich der Zellmorphologie und Virusproduktion durchgeführt, um Veränderungen an den Zellen rechtzeitig zu erkennen. Dazu läßt man Zellen auf vorgeätzten Objektträgern anwachsen und sich vermehren. Die Zellen werden dann fixiert und gefärbt. Wie Abbildung 1 zeigt, handelt es sich bei den Cl-F-2 Zellen um Vertreter des epithelialen Zelltyps. Durch die Färbung sind einzelne Zellstrukturen unterscheidbar geworden, ebenso die Plasmabrücken zwischen benachbarten Zellen.

Als Kriterium für die Virusproduktion der Zellen wurde die Hämadsorption herangezogen. Dabei adsorbieren Erythrozyten bestimmter Spezies an die Membran von Zellen, die mit häm-

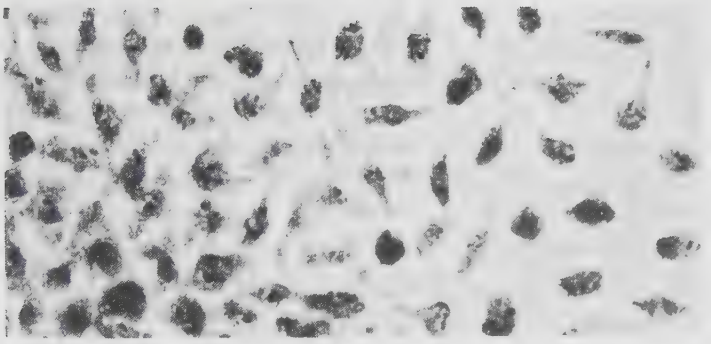


Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahme von Cl-F-2 Zellen nach May-Grünwald-Giemsa Färbung.
Cl-F-2 Zellen wurden auf einem vorgeätzten Objektträger in einer Petrischale eingesät. Nach Erreichen einer ausreichenden Zelldichte erfolgte die Fixierung und Anfärbung nach May-Grünwald-Giemsa (Mayr et al. 1974): 15 min. fixieren, 5 min. May-Grünwaldfärbung 1:5, 15 min. Giemsa Färbung, 10 min. waschen, dann je 10 min. mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässern. Fotografiert wurde mit Kleinbild-Dia-Film; Mikroskopvergrößerung 250-fach.

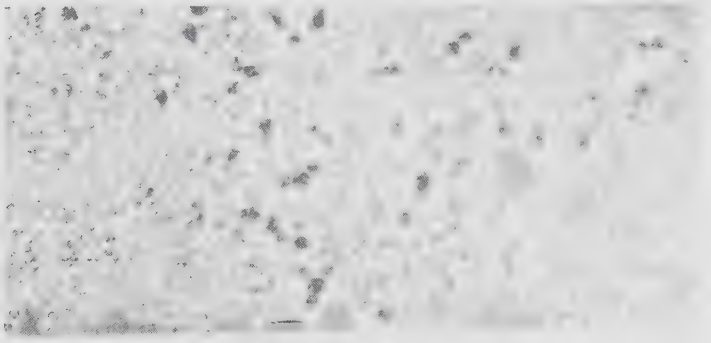


Abb. 2: Hämadsorptionstest an Cl-E-8 Zellen

Von Cl-E-8 Zellen in einer 25 cm^2 Roux-Flasche wurde das Medium abgenommen und die Zellen mehrfach mit Pbs^- gewaschen. Anschließend wurde eine 1%ige Lösung gewaschener human-O-Erythrozyten überschichtet, bis die Zellen vollständig bedeckt waren. Die Adsorption der Erythrozyten erfolgte für 60 min. bei 4 °C. Dann wurden die nichtgebundenen Erythrozyten durch Waschen mit Pbs^- entfernt und die Zellen unter dem Mikroskop auf Hämadsorption durchgemustert. Mikroskopvergrößerung 200-fach.

agglutinierenden Viren (z.B.6/94) infiziert sind. Auf diese Weise konnten die verwendeten Zell-Linien Cl-E-8 und Cl-F-2 auf ihre Virusproduktion überprüft werden. In der Abbildung 2 sind die an die Zellen gebundenen Erythrozyten deutlich als kleine weiße Kreise zu erkennen. Damit ist für diese Zellen nachgewiesen, daß sie noch virale Proteine synthetisieren. Der Anteil der Zellen mit positiver Hämadsorption entspricht den in der Literatur angegebenen Werten (Koprowski et al.1975). Dabei muß man berücksichtigen, daß eine statistisch gesicherte Aussage erst nach Durchsicht einer größeren Zellzahl möglich ist.

2.1.2. Virusvermehrung im bebrüteten Hühnerei

Diese Art der Virusvermehrung wird in der Virologie schon viel länger angewandt als die Züchtung in Zellkulturen. Einer hohen Virusausbeute und leichteren Handhabung des infizierten Hühnereies stehen eine Reihe von Nachteilen gegenüber: Auch als "virusfrei" bezeichnete Eier sind während der Vorbebrütungszeit und nach Infektion mit dem Impfvirus einem erhöhten Kontaminationsrisiko durch Fremdviren ausgesetzt; die radioaktive Markierung der Viren läßt sich andererseits im Hühnerei nicht so gut durchführen und es treten Probleme bei der Abfallbeseitigung auf; außerdem ist der Prozentsatz an defektiven Viren bei Vermehrung im Brutei höher als in Zellkulturen. Zur Züchtung von 6/94 Viren werden befruchtete, virusfreie Hühnereier für 10-11 Tage in einem speziellen Eierbrutschrank bei 37°C, 60% Luftfeuchtigkeit vorbebrütet und in bestimmten Zeitabständen automatisch gewendet. Nach Inokulation des Virusmaterials (1×10^5 EID 6/94 Virus) in die Allantoishöhle werden die Eier aufrecht stehend bei 33°C für 4 Tage weiterbebrütet. Dann öffnet man vorsichtig die Eischale und entnimmt die virushaltige Allantoisflüssigkeit. Diese wird durch niedertourige Zentrifugation von Zelltrümmern befreit. Sie dient entweder als Ausgangsmaterial für eine anschließende Virusreinigung (siehe 2.2.), oder kann als Impfmaterial für wei-

tere Virusvermehrung eingesetzt werden; in diesem Fall ist eine Lagerung der Viren bei -120°C in der Dampfphase des flüssigen Stickstoffs ohne merklichen Infektiositätsverlust möglich (Mayr et al. 1974, Lewandowski et al. 1974).

2.1.3. Züchtung von ^{3}H-markierten Viren in Zellkultur

Zur Markierung von 6/94 Viren mit Tritium wurden Rollerkulturen mit Cl-E-8 und Cl-F-2 Zellen in Kulturflaschen von 650 cm^2 Wandfläche verwendet. Nach Erreichen eines weitgehend geschlossenen Zellrasens wird der Serumanteil im Medium auf 2% reduziert und die Tritium-markierten Ribonucleoside (2-^{3}H)-Adenosin (20-25 Ci/mMol), (8-^{3}H)-Guanosin (20-25 Ci/mMol) und (5,6-^{3}H)-Uridin (45-50 Ci/mMol) dem Nährmedium zugesetzt. Pro Woche erhält jede Rollerflasche 10 ml Medium mit Zusatz von 30 µCi/ml ^{3}H-Nucleosiden. Nach Ablauf von 7 Tagen nimmt man den Kulturüberstand vorsichtig ab und ersetzt ihn durch neues Nährmedium mit entsprechender Menge Radioaktivität. Die virushaltigen Überstände werden niedertourig von Zelltrümmern befreit und bis zur Virusreinigung bei -20°C eingefroren aufbewahrt. Einzelheiten der Virusreinigung sind in 2.2. beschrieben.

2.1.4. Züchtung von ^{32}P-markierten Viren in Zellkultur

Dichtgewachsene Rollerkulturflaschen (490 cm^2) mit Cl-E-8 oder Cl-F-2 Zellen läßt man über Nacht in phosphatfreiem MEM F-15 Medium mit 5% dialysiertem FKS weiterwachsen. Am nächsten Morgen wird das Medium gewechselt und 1 mCi ^{32}P pro Rollerflasche zugesetzt. Nach 24 Stunden wird wieder das Medium gewechselt und neues ^{32}P zugesetzt. Dieses kann fortgesetzt werden, bis die Zellen aufgrund von Phosphatmangel degenerieren. Die Kulturüberstände werden von Zelltrümmern gereinigt und gesammelt bei -20°C bis zur Virusreinigung aufbewahrt.

2.2. Virusreinigung und Charakterisierung

Nach erfolgreicher Vermehrung in Zellkulturen oder Bruteiern müssen die Viren konzentriert und von Wirtszell-Proteinen und -Nucleinsäuren befreit werden. Je nach Weiterverwendung der Viren werden verschiedene Reinigungsverfahren angewendet.

2.2.1. Fraktionierte Zentrifugation in Sucrose-Gradienten

Bei diesem Standardverfahren (Mayr et al.1977) wird die Virussuspension zunächst in Zentrifugenröhrchen überführt, in die 2 ml einer 60%igen (wt/wt) Sucrose-Lösung in Pbs^- vorgelegt wurden. Bei der anschließenden Zentrifugation im SW 25 Rotor einer MSE-Ultrazentrifuge für 90 min. bei 24.000 rpm, 4^oC, sedimentieren die Viren auf die 60%ige Sucroselösung. Da ihre Dichte geringer ist als die der Zuckerlösung, können sie nicht in die Zuckerschicht eindringen; es wird dadurch ein Zusammenballen der Viren am Röhrchenboden vermieden, bei dem eine große Zahl der Viruspartikel deformiert und damit inaktiviert würde. Nach Beendigung des Zentrifugenlaufes wird die überstehende Flüssigkeit bis knapp über die Virusschicht abgenommen und neue Virussuspension kann überschichtet werden. Durch mehrfache Wiederholung dieses Zentrifugationsschrittes werden die Viren stark konzentriert.
Im nächsten Reinigungsschritt, dem Stufengradienten, werden die Viren durch eine 25%ige Sucroseschicht sedimentiert; dadurch trennt man Verunreinigungen durch kleine und leichte Zellproteine ab. Auch bei diesem Gradienten werden 2 ml 60%-ige (wt/wt) Sucroselösung vorgelegt, über die man dann 5 ml 25 %ige Sucroselösung (wt/wt) und anschließend die Virussuspension überschichtet. Die Zentrifugation erfolgt 90 min. bei 24.000 rpm, 4^oC im SW 25 Rotor. Nach dem Lauf homogenisiert man vorsichtig die abgenommene Virusschicht mit einem Douncer "L" und verdünnt sie mit Pbs^-.
Dann wird die Virussuspension auf einen linearen Dichtegradienten aus 25-60% Sucroselösung überschichtet und 16 Std. im

Rotor SW 25 einer MSE-Ultrazentrifuge bei 20.000 rpm, 4°C zentrifugiert. Es entsteht eine deutlich sichtbare Virusschicht aus Partikeln gleicher Dichte; leere Virushüllen und Viren mit anderer Dichte werden bei diesem Schritt abgetrennt. Viren dieser Reinigungsstufe wurden zur Infektion von Zellen oder Brut-Eiern verwendet. Wenn die Infektion erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen soll, können die Viren nach Zusatz von Schutzkolloiden bei -120°C eingefroren gelagert werden (Mayr et al.1977).

2.2.2. Pelletieren der Viren im Winkelrotor

Für große Mengen Virussuspension, wie sie bei der Viruszucht in Zellkulturen anfallen, eignet sich die Sedimentation auf Sucrose-Schichten im SW 25 Rotor wegen der zu geringen Kapazität nicht. Wenn die Viren nur zur Gewinnung von viraler RNA verwendet werden sollen, ist eine weniger schonende Reinigung möglich. Die virushaltigen Zellüberstände pelletiert man dabei für 60 min. bei 4°C, 35.000 rpm im Beckman Ti 45 Winkelrotor. Pro Zentrifugenlauf können die Viren aus ungefähr 500 ml Zellüberständen konzentriert werden. Nach dem Zentrifugieren wird die überstehende Flüssigkeit bis knapp über dem Sediment abgenommen und neue Virussuspension überschichtet, u.s.w.. Wenn die gesamten Zellüberstände abzentrifugiert sind, wird möglichst alle Flüssigkeit von den Viruspellets abpipettiert. Dann resuspendiert man das Sediment in einem kleinen Volumen Puffer. Anschließend erfolgt das Abtrennen von verunreinigenden Zellproteinen im Stufengradient und das Bandieren der Viren im Dichtegradienten wie in 2.2.1. beschrieben.

2.2.3. Kombinierte Ultrafiltration und Ultrazentrifugation zur Reinigung von Viren aus größeren Volumina

Zur Isolierung von Viren aus großvolumigen Zellüberständen bietet sich alternativ zur High-speed-Pelletierung die Fil-

tration durch Ultrafiltrations-Membranen an. Diese Membranen zeichnen sich durch eine glatte Oberfläche mit Poren eines definierten Durchmessers aus. Bei der Auswahl des Membrantyps muß darauf geachtet werden, daß die Viren quantitativ zurückgehalten werden, während im Nährmedium enthaltene Proteine möglichst vollständig die Membran passieren sollen. Zur Konzentrierung des 6/94 Virus wurde eine Membran vom Typ XM 300 mit 15 nm Porenweite eingesetzt. Um die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten über der Filtermembran zu verhindern, erfolgt die Ultrafiltration in einer Filterzelle mit Rühreinrichtung. Neue, virushaltige Zellüberstände werden von einem Vorratsgefäß nachgeliefert, das unter einem Überdruck von 1,5 bar steht. Es kann eine Konzentrierung um den Faktor 20-70 erreicht werden. Wenn die Durchflußrate der Filtrationseinheit durch Ansteigen der Proteinkonzentration im Filter stark zurückgeht, wird das Viruskonzentrat zur weiteren Reinigung entnommen. Diese besteht aus den in 2.1.1. beschriebenen Schritten Stufengradient und Dichtegradient. Durch Vergleiche der mit Ultrafiltration gewonnenen Viren im Elektronenmikroskop mit Viren aus anderen Reinigungsverfahren konnte sichergestellt werden, daß durch die Filtration keine morphologisch erkennbaren Schäden an den Viruspartikeln auftreten.

2.2.4. Elektronenmikroskopie

Zur morphologischen Charakterisierung der gereinigten Viren wurden mehrmals Proben nach dem letzten Reinigungsschritt entnommen und für das Elektronenmikroskop präpariert. Virussuspensionen werden in verschiedenen Verdünnungen mit SSC mit 2%igem Uranyl-Formiat in H_2O negativ kontrastiert (Lebermann 1965). Als Objektträger dienen Kupfernetze mit reinem Kohlefilm. Die Aufnahmen wurden mit einem Siemens-Elmiskop 102 auf Kodak Plan-Film gemacht.

2.2.5. Hämagglutinations-Hemmungstest

Zur serologischen Charakterisierung der gereinigten Virussuspension wurde der Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) herangezogen. Dieser Test beruht auf einer Hemmung der Agglutination von Viren mit bestimmten Erythrozyten, wenn die Viren vorher mit einem homologen Antiserum reagieren konnten. Der Test wurde als Mikro-Test (Mayr et al.1977) durchgeführt. Dazu mischt man in Mikrotiter-Platten 25 µl der entsprechenden Serumverdünnung in Pbs^- mit 25 µl einer auf 4 HA eingestellten Virussuspension, d.h. mit einer Virusmenge, die ohne Antiserum mit 4-facher Sicherheit eine positive Hämagglutination ergibt und läßt diese bei 22°C für 60 min. reagieren. Anschließend werden 25 µl einer 1%igen Suspension von human-0-Erythrozyten zugegeben; nach 60-90 min. Sedimentationszeit bei 4°C kann der Test abgelesen werden. Als Hemmungstiter des Serums gilt der Reziprok-Wert derjenigen Verdünnungsstufe, bei der die Hämagglutination gerade noch aufgehoben ist. Als Referenzserum wurde das'Parainfluenza-1' Antiserum der Behringwerke eingesetzt. Als Antigen bei der Herstellung dieses Serums diente der Sendai-Stamm D 52 (ATCC-Nr. VR105), der 1952 von einem Fall von Säuglingspneumonitis isoliert wurde (Kuroya et al.1953). Die Bezeichnung'Sendai-D 52' ist identisch mit 'Sendai-Fushimi'. Dieser Sendai-Stamm kreuzreagiert stark mit dem 6/94 Virus. Er ist serologisch von diesem nicht zu unterscheiden (Lief et al.1975) und eignet sich daher zur serologischen Überprüfung einer Viruspräparation auf 6/94 Viren.

2.3. Isolierung und Reinigung von 6/94 RNA

2.3.1. Isolierung von RNA aus gereinigten 6/94 Viren

Für die Extraktion der viralen RNA muß zunächst noch die Sucrose von den gereinigten Viren entfernt werden. Dazu verdünnt man die Virussuspension mit Pbs^- und pelletiert die Viren im Ti 60 Rotor der MSE-Ultrazentrifuge für 40 min. bei

43.000 rpm und 4°C. Nun resuspendiert man das Virussediment zunächst in STE-Puffer. Dann wird SDS bis zu einer Konzentration von 0,1% und das proteolytische Enzym Pronase bis zu einer Endkonzentration von 0,2-0,5 mg/ml zugegeben. Die Inkubation erfolgt für mindestens 2 Std. bei 37°C. Anschließend erhöht man die SDS-Konzentration auf 1% und gibt ein Volumen mit STE gesättigtes und mit KOH neutralisiertes Phenol zu. Nach intensivem Durchmischen werden die beiden Phasen durch niedertourige Zentrifugation getrennt. Die wässrige Phase, die die Nucleinsäure enthält, wird abgenommen und nochmals mit Phenol von Proteinen gereinigt. Nun gibt man zur wässrigen Phase 2 1/2 Volumen 96%igen Alkohol, erhöht die NaCl-Konzentration auf 300-400 mM und fällt die Nucleinsäure bei -20°C im Tiefkühlschrank für einige Stunden. Nach dem Fällen wird die RNA in der Sorvall-Zentrifuge für 30 min. bei 10.000 rpm, -20°C pelletiert. Der Überstand wird verworfen und die RNA im Vakuum getrocknet. Dann löst man das Pellet in STE-Puffer und fällt wieder mit 96%igem Alkohol. Unter Alkohol ist die RNA über lange Zeit ohne Degradation haltbar.

2.3.2. Messung von UV-Spektren der Nucleinsäuren

Zur Bestimmung von Protein- und Phenol-Verunreinigungen der isolierten Nucleinsäuren wurden kontinuierliche UV-Spektren im Bereich von 300-200 nm Wellenlänge aufgenommen. Dazu wurde ein Beckman Spektralphotometer "Modell 25" mit angebautem x-y Schreiber verwendet. Präparationen mit einem Extinktionsverhältnis 260:280 nm von annähernd 2:1 werden als rein bezeichnet. In der Abbildung 3 ist das Profil einer Protein- und Phenol-freien RNA wiedergegeben.

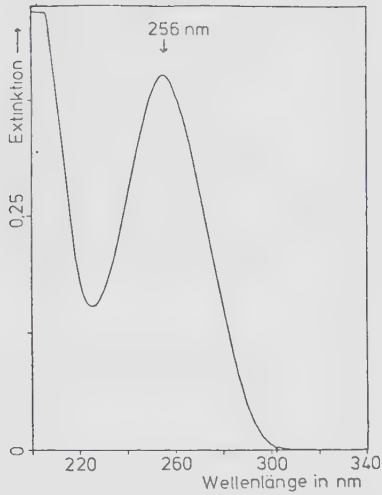


Abb. 3: Kontinuierliches UV-Spektrum einer gereinigten RNA im Bereich von 200 - 340 nm Wellenlänge.

Zur Messung wurde ein Beckman Spektralfotometer Typ "25" mit x-y Schreiber verwendet.

2.3.3. Sucrose-Gradienten zur Auftrennung von Nucleinsäuren mit unterschiedlichem s-Wert

Um die Aussagekraft der im Ergebnisteil beschriebenen Hybridisierungsexperimente noch weiter zu steigern, wurde zusätzlich zur intensiven Reinigung der Viren auch die daraus isolierte RNA nach ihrem Sedimentationsverhalten aufgetrennt. Dadurch konnten mögliche Verunreinigungen durch zelluläre RNA mit hoher Sicherheit entfernt werden; die Sedimentationskonstante von zellulärer RNA liegt in der Regel unter 35s. Trotz hohen Materialverlusten bei diesem Reinigungsschritt wurde in die weiteren Experimente nur hochmolekulare RNA um 50s als virusspezifische Probe eingesetzt.
Zum Abtrennen von viraler 50s RNA wurden kontinuierliche Sucrose-Gradienten verwendet. Dazu überschichtet man die RNA-Probe auf einen linearen Sucrose-Gradienten von 5-20% (wt/wt)

in STE-Puffer mit 0,1% SDS und zentrifugiert im SW 56 Rotor einer Beckman-Ultrazentrifuge für 80 min. bei 17°C und 45.000 rpm. Anschließend wird der Gradient in eine Abtropfvorrichtung eingespannt und nach Durchfluß durch ein Spektralphotometer (LKB-Uvicord, 260nm Wellenlänge) mit dem Fraktionssammmler (LKB-Ultrarac) in 25 gleiche Fraktionen geteilt.
In einem Parallel-Gradienten, der unter identischen Bedingungen hergestellt wurde, wird als Positionsmarker zelluläre gesamt-RNA zentrifugiert. Diese weist typische Extinktionsmaxima bei 4s, 18s und 28s auf.
Alle Fraktionen des Virus-RNA Gradienten, die über einem s-Wert von 35s liegen (verglichen mit der zellulären RNA), werden gepoolt und gefällt. Diese RNA wird als virale 6/94 RNA bezeichnet.

2.3.4. Bestimmung der spezifischen Aktivität von Nucleinsäuren

Da bei Experimenten mit radioaktiv markierter Nucleinsäure mit Konzentrationen gearbeitet wird, die weit unter der Meßgrenze von normalen Spektralphotometern liegen, muß für quantitative Aussagen das Verhältnis von eingebauter Radioaktivität und Nucleinsäuremenge bestimmt werden. Dieses Verhältnis, die spezifische Aktivität, wird bei in-vitro synthetisierten Nucleinsäuren rechnerisch ermittelt, während es bei in-vivo markierten Nucleinsäuren durch Messung bestimmt werden muß. Dazu wird zunächst ein kontinuierliches UV-Spektrum aufgenommen (siehe 2.3.2.), aus dem sich die Menge an reiner Nucleinsäure genau errechnen läßt. Dabei gilt der Zusammenhang: 1 OD_{256} entspricht 40 µg RNA pro ml bzw. 50 µg DNA pro ml. Dann mißt man die säurefällbare Radioaktivität in einem Aliquot der Probe (siehe 2.5.2.). Aus beiden Messungen läßt sich die spezifische Aktivität in cpm/µg Nucleinsäure angeben.

2.4. Markierung und Isolation von zellulären Nucleinsäuren

2.4.1. Markierung von zellulärer gesamt-RNA

Zur Markierung von zellulärer RNA gibt man zu einer dicht gewachsenen 150 cm^2 Roux-Flasche mit C1-F-2 Zellen 250 µCi (5,6-^{3}H)Uridin (45-50 Ci/mMol) in 20 ml Medium mit 5% FKS und inkubiert die Kultur für 5 Tage bei 37^{o}C. Dann wird das Medium abgenommen und aus den Zellen die gesamt-RNA isoliert (2.4.3.).

2.4.2. Markierung von virusspezifischer RNA in Zellen

Zur selektiven Markierung von virusspezifischer RNA in Zellen muß die zelluläre RNA-Synthese inhibiert werden. Dies geschieht durch Zusatz von Act.D zum Medium.
Bei dichtgewachsenen 150 cm^2 Roux-Flaschen mit Fusionszellen (C-2, E-8 oder F-2) wird das Kulturmedium durch 20 ml neues Nährmedium mit 2% FKS und 10 µg/ml Act.D ersetzt. Nach 1,5 Std. Inkubation bei 33^{o}C wird das Medium gewechselt und 10-15 µCi/ml ^{3}H-Uridin (45-50 Ci/mMol) zugesetzt. 4-12 Std. später wird das Medium abgenommen und die RNA aus den Zellen isoliert (2.4.3.). Bei der späteren Analyse der unter Act.D synthetisierten ^{3}H-RNA im Sucrose-Gradienten kann die aus der Vormarkierungszeit vorhandene "kalte" zelluläre RNA als interner Marker dienen.

2.4.3. Extraktion von gesamt-RNA aus Zellen

Nach Abnehmen des Kulturmediums werden die Zellen 1-2 mal mit Pbs$^-$ gewaschen. Dann kratzt man die Zellen mit einem Teflon-Schaber in 2,5 ml Pbs$^-$ pro 100 cm^2 Kulturfläche ab. Mit weiteren 2,5 ml Pbs$^-$ werden die noch in der Flasche verbliebenen Zellen abgespült. Die Zellsuspension kühlt man nun auf 4^{o}C ab und pelletiert die Zellen vorsichtig bei 1000g. Nach Verwerfen des Überstandes werden 700 µl eines hypotonischen

Lysopuffers zugegeben. Diesen Puffer läßt man 5 min. im Eisbad einwirken und homogenisiert dann die Zellen 20-mal mit einem Glas-Douncer "S". Anschließend wird durch Zugabe von 70 µl des Puffers "Z" die Salzkonzentration wieder normalisiert und nach Durchmischen für 10 min. bei 10.000 rpm, 4°C, in der Sorvall-Zentrifuge die Zell-Kerne und Mitochondrien abzentrifugiert. Aus dem Überstand wird durch SDS/Pronase-, SDS/Phenol-Behandlung und Äthanol-Fällung die zelluläre gesamt-RNA gewonnen (2.3.1.).

2.4.4. Isolierung von poly-A haltiger RNA

Das Abtrennen von poly-A haltiger RNA aus zellulärer gesamt-RNA geschieht mit Hilfe der Affinitätschromatographie an oligo-dT Zellulose (Gilham et al.1964, Faust et al.1973). Dazu erstellt man in einer sterilen 1 ml Spritze eine kleine oligo-dT Säule mit ungefähr 0,4 ml oligo-dT Zellulose. Die Säule wird mit'Hochsalzpuffer' gewaschen, bis der Durchlauf keine Veränderung der optischen Dichte bei 256 nm mehr zeigt. Die zu trennende RNA-Probe nimmt man dann in einem kleinen Volumen 'Niedrigsalzpuffer' auf und erhöht durch nachträgliche Zugabe von 3 M NaCl die Salzkonzentration auf 500 mM. Dann wird die Probe auf die Säule aufgetragen und mit 5 ml 'Hochsalzpuffer' nachgewaschen. Der Ausfluß der Säule läuft durch ein UV-Spektralphotometer (Typ LKB-Uvicord mit x-y Schreiber bei 256 nm Wellenlänge) und wird anschließend mit dem LKB-Fraktionssammler 'Ultrarac' in 0,5 ml Fraktionen geteilt. In den ersten 10 Fraktionen befindet sich die nicht gebundene non-poly-A RNA. Nun eluiert man mit 5 ml 'Niedrigsalzpuffer' die gebundene poly-A haltige RNA. Der Ausfluß der Säule wird wieder optisch gemessen und fraktioniert. Anschließend bestimmt man bei markierten Proben die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen (2.5.2.).

2.4.5. Markierung von zellulärer DNA mit Tritium

Zur Markierung von zellulärer DNA verwendet man eine kurz vorher trypsinierte Kultur (z.B. Cl-E-8), bei der die Zellen auf ungefähr 1/5 des vollständigen Zellrasens verdünnt sind. Nach dem Trypsinieren läßt man die Zellen über Nacht anwachsen, wechselt am nächsten Tag das Medium der 75 cm^2 Roux-Flasche (10 ml MEM F-15 mit 10% FKS) und gibt 500 µCi ^{3}H-Thymidin (20-30 Ci/mMol) hinzu. Nun wird für 3-5 Tage bei 33°C inkubiert. Dann nimmt man den Überstand ab und isoliert aus den Zellen die DNA (2.4.6.).

2.4.6. Isolierung von DNA aus Zellen

Die Isolierung von DNA aus Zellen folgt zunächst der in 2.4.3. beschriebenen RNA-Extraktion. Von den Zellkulturen wird das Medium abgenommen und die Zellen werden anschließend mit Pbs^- gewaschen. Dann kratzt man sie mit einem Teflonschaber in Pbs^- von der Wand der Kulturflasche, spült die restlichen Zellen ab, kühlt im Eisbad und pelletiert die Zellen vorsichtig bei 1000g für 10 min. bei 4°C. Der überstehende Puffer wird abgenommen und durch hypotonischen Lysopuffer ersetzt. Nach 5 min. Einwirkzeit werden die Zellen mit einem Douncer "S" 20-mal homogenisiert. Dann gibt man ein zehntel Volumen Puffer "Z" zu und trennt durch niedertourige Zentrifugation bei 1000g für 10 min., 4°C die Zellkerne ab. (Die Mitochondrien können aus dem Überstand durch Zentrifugation für 20 min. bei 10.000g isoliert werden.) Die Zellkerne werden durch Sedimentation in 0,25 M Sucrose/STE in der Christzentrifuge für 14 min. bei 5000rpm, 4°C von zellulären Verunreinigungen befreit. Aus den gereinigten Kernen wird dann durch SDS/Pronase-, SDS/Phenol- und Äthanolbehandlung (2.3.1.) die zelluläre DNA extrahiert. Nach dem Umfällen wird die DNA zur Beseitigung von RNA-Kontaminationen einem Alkali-Verdau unterzogen (2.5.3.). Durch Messung des kontinuierlichen Spektrums im UV-Bereich wird die Reinheit der DNA überprüft

und die DNA-Menge bestimmt (2.3.2.). Außerdem wird bei radioaktiv markierter DNA die spezifische Aktivität bestimmt (2.3.4.).

2.5. Synthese von virusspezifischer ^{3}H-cDNA

Dieses in-vitro System wurde zur Synthese einer spezifischen, hochmarkierten 6/94 ^{3}H-complementär DNA (cDNA) eingesetzt. Ursprünglich wurde die Synthese von einer cDNA Kopie der viralen RNA bei den RNA-Tumorviren beobachtet. Das sich daraus ableitende in-vitro System mit oligo-dT als exogen zugesetztem synthetischen Primer für die Reverse Transcription an RNA-Tumorvirus RNA wurde für die Synthese von 6/94 ^{3}H-cDNA modifiziert. Wichtigste Veränderung des Ansatzes war die Verwendung des Primers oligo-dG, der sich als essentiell für die Reverse Transcription an 6/94 RNA herausstellte. Weiterhin wurden die Act.D- und Salzkonzentrationen optimiert (Neubert 1976).

2.5.1. In-vitro ^{3}H-cDNA Synthese System

Der optimierte Standardansatz für die Reverse Transcription an 6/94 RNA hat folgende Zusammensetzung:

Standardmix 10-fach		10 µl
BSA (4 mg/ml)		5 µl
Tris 0,12 M		5 µl
3 dNTPs je 3,3 mM		10 µl
^{3}H-dGTP (13 Ci/mMol)		20 µl
Reverse Transcriptase 10 U		5 µl
Act.D (2 mg/ml)		10 µl
6/94 RNA (100 µg/ml)		4 µl
oligo dG (0,2 mg/ml)		4 µl
H_2O	ad	100 µl

Der Ansatz wird im Eisbad in autoklavierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen gemischt. RNA und Primer dG werden zusammen für 5 min. bei 60°C präinkubiert. Die cDNA Synthese erfolgt für 60 min. bei 42°C im Wasserbad. Zu bestimmten Zeiten werden Aliquots entnommen und die eingebaute Radioaktivität bestimmt (2.5.2.).

2.5.2. Messung der säurefällbaren Radioaktivität in Nucleinsäuren

Als Kriterium zur Messung der Einbaurate bei der cDNA Synthese bzw. zur Messung von radioaktiv markierten Nucleinsäuren bei Hybridisierungsexperimenten wurde die säurefällbare Radioaktivität herangezogen. Bei diesem Verfahren werden nur Nucleinsäuren gefällt, die größer als rund 20 Nucleotide sind. Kürzere Moleküle bleiben in Lösung; sie werden bei der nachfolgenden Filtration entfernt.
Die zu messende Probe wird zunächst auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml BSA gebracht, dann wird TCA mit 1%igem Diphosphat zugegeben bis zu einer Endkonzentration von mindestens 5%. Nach 15 min. Fällung im Eisbad werden die Proben durch vorgeweichte Millipor Nitrozellulose-Filter (Porengröße 600 nm) filtriert und mit 30 ml 5%iger TCA nachgespült. Die Filter werden 30 min. im Wärmeschrank bei 80°C getrocknet und dann in 5-10 ml Toluol-Szintillator im Szintillationszähler "Nuclear Chicago Mark II" gezählt. Um unspezifische Gerätefehler gering zu halten, werden alle Proben doppelt gezählt. (Die Zählausbeute dieses Gerätes beträgt zur Zeit etwa 60% im Tritium-Kanal).

2.5.3. Reinigung der cDNA

Im ersten Schritt der Reinigung wird die synthetisierte cDNA von Enzym- und Schutzproteinen aus dem Inkubationsansatz befreit. Dies geschieht durch die in 2.3.1. beschriebene SDS/

Phenol-Extraktion. Im Anschluß an die Alkohol-Fällung wird die in STE-Puffer gelöste cDNA in 0,2 M KOH von der als Template dienenden RNA befreit. Dieser Alkali-Verdau wird bei 25°C im Wasserbad für 24 Std. durchgeführt. Anschließend muß man die Probe wieder neutralisieren. Die cDNA wird in Aliquots zu je 10.000 cpm aufgeteilt und bei -20°C im Tiefkühlschrank eingefroren gelagert.
Während der Reinigung der cDNA entnimmt man von allen Reinigungsstufen kleine Proben und mißt die Radioaktivität. Durch diese kontinuierliche Kontrolle ist man jederzeit über das Verbleiben der ^{3}H-cDNA informiert und kann durch entsprechende Schritte größere Reinigungsverluste vermeiden.

2.6. In-vitro Synthese von virusspezifischer ^{3}H-cRNA

Alternativ zur in-vivo Markierung von 6/94 RNA wurde die virale RNA auch in einem in-vitro System radioaktiv markiert. Hauptziel dabei war die Erhöhung der Nachweis-Spezifität der ^{3}H-6/94 RNA. Als Grundlage für das in-vitro System diente eine Arbeit von O.Bernard (Bernard et al.1977). Diese hatte zeigen können, daß die DNA-abhängige RNA Polymerase aus E.coli bei geänderten Salzbedingungen in der Lage ist, auch an einer RNA als Template eine RNA-Kopie komplementär synthetisieren zu können.

2.6.1. In-vitro cRNA Synthese System

Für die ^{3}H-cRNA Synthese an 6/94 RNA wurden die Bedingungen durch Vorversuche optimiert. Die gefundenen Werte weichen von den publizierten Daten ab und sind nachfolgend als optimierter Standardansatz zusammengestellt:

Standardmix	4-fach	25 µl
Ribotriphosphatmix	4-fach	25 µl
4 rNTPs je 1,2 mM		
^{3}H-CTP 200 µCi/ml		
RNA-Polymerase	27 mg/ml	1 µl
6/94 RNA	50 µg/ml	5 µl
H_2O	ad	100 µl

Der Ansatz wird im Eisbad in autoklavierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen gemischt. Bei einem Teil der Versuche wurde die RNA bei 55°C für 5 min. präinkubiert. Die cRNA Synthese erfolgte bei 37°C für 120 min. im Wasserbad. Zu bestimmten Zeiten werden Aliquots entnommen und die eingebaute Radioaktivität bestimmt (2.5.2.).

2.6.2. Reinigung der ^{3}H-cRNA

Nach Abschluß der Reaktion werden aus dem in-vitro cRNA Syntheseansatz alle Proteine mit Hilfe einer SDS/Phenol Behandlung und anschließender Alkoholfällung entfernt (2.3.1.). Man bestimmt in einem Aliquot des gefällten Materials die eingebaute Radioaktivität (2.5.2.) als Maß für die Gesamtsynthese. Die ^{3}H-cRNA wird in Aliquots zu 30.000 cpm unter Alkohol bei -20°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

2.7. Flüssighybridisierungssystem

Der verwendete Hybridisierungsansatz hat ein Standardvolumen von 100 µl für Versuche mit ^{3}H-cDNA bzw. von 50 µl für Versuche mit ^{3}H - RNA. Hybridisiert wird in Gegenwart von 400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 und 2 mM EDTA. Inkubationstemperaturen und Zeit, sowie die Konzentrationen der eingesetzten Nucleinsäuren sind für die verschiedenen Hybridisierungsexperimente unterschiedlich und jeweils bei den Ergebnissen angegeben. Bei allen Versuchen mit zellulärer DNA werden die

DNA und die ^{3}H-RNA zusammen für 10 min. bei 100°C präinkubiert und dann schnell auf 0°C abgekühlt. Die Formamid-Konzentration beträgt für Versuche mit cDNA 50% und für Versuche mit ^{3}H-RNA 60%.

2.8. Charakterisierung der Nucleinsäurehybride

Zur möglichst eindeutigen Analyse der Hybride werden verschiedene physikalische und biochemische Charakterisierungsverfahren angewendet, zum Teil einzeln oder auch in Kombination.

2.8.1. Dichtegradienten-Analyse

Diese erstmals von Meselson (Meselson et al.1957) angewandte Technik beruht auf der Beobachtung, daß Makromoleküle in einem Dichtegradienten in dem ihrer Schwimmdichte entsprechenden Bereich bandieren. Der Dichtegradient wird durch Sedimentation einer Lösung mit niedrigen Molekulargewicht (CsCl) in einem konstanten Schwerefeld erzeugt. Diese zunächst für die Analyse von DNA entwickelte Technik konnte durch die Einführung von Cs_2SO_4 als Gradientenmaterial auch für die Charakterisierung von RNA und von RNA-DNA Hybriden eingesetzt werden. Die Verdichtung der Hydrathüllen der Nucleinsäuremoleküle im Cs_2SO_4-Gradienten erlaubt die Analyse von Molekülen mit einer Dichte, für die der CsCl- Gradient nicht mehr ausreicht. Die zu untersuchende Nucleinsäurelösung (max.700 µl) wird mit 8 ml Cs_2SO_4-Lösung in STE, Dichte 1,55 g/cm^{3}, gemischt und in Polypropylen Röhrchen (Oak Ridge) gefüllt. Um Interaktionen der Nucleinsäure mit der Röhrchenwand zu verringern, setzt man jedem Gradienten 50 µl t-RNA Lösung (2 mg/ml) zu. Der Gradient wird mit Paraffin überschichtet und im Ti 50 Rotor einer Beckman Ultrazentrifuge mindestens 60 Std. bei 42.000 rpm, 15°C zentrifugiert. Anschließend werden die Röhrchen von unten angestochen und der Gradient wird mit dem 'LKB-Ultrarac-Fraktionssammler' in 26-30 Fraktionen aufgeteilt. Um die individuellen Dichteschwankungen der Gradienten zu normalisieren, bestimmt

man von jeder dritten Fraktion den Refraktionsindex. Basierend auf der von Szybalski (Szybalski 1968) angegebenen Tabelle bestimmt man mit Hilfe eines Rechnerprogramms, das dem nichtlinearen Zusammenhang zwischen Refraktionsindex und Dichte von Cs_2SO_4-Lösungen Rechnung trägt, die mit den Refraktionswerten der einzelnen Fraktionen korrespondierenden Dichten. Die Fraktionen werden, wie in 2.5.2. beschrieben, gefällt, filtriert und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Bei niedrigen Impulszahlen sind längere Zählzeiten erforderlich, um den statistischen Fehler der Zählung niedrig zu halten. Um aus den ermittelten Dichtewerten der Fraktionen die korrespondierende Dichtegerade in guter Näherung zu erhalten, werden die Dichte-Werte einer Regressionsanalyse unterzogen (Hewlett Packard, Programmsammlung 1975). Gradienten mit einem Regressionskoeffizienten r^2 kleiner 0,98 werden verworfen.

2.8.2. Enzymatischer Abbau von Nucleinsäuren

Eine weitere Charakterisierungsmöglichkeit für Nucleinsäuren bildet ihr nucleolytischer Abbau. Durch Einsatz verschiedener Enzyme ist zwischen Desoxi- und Ribonucleinsäure, sowie zwischen Einzelstrang- und Doppelstrangstrukturen zu unterscheiden.
Pankreatische Ribonuclease A (RNase A) verdaut Einzel- und Doppelstrang RNA, greift aber RNA-DNA Hybride kaum meßbar an (Tanaguchi 1974). Vor Gebrauch wird das Enzym 10 min. bei 80°C präinkubiert. Besondere Ionenbedingungen müssen nicht eingehalten werden, die Standardkonzentration im Ansatz beträgt 20 µg/ml (Kunitz 1940, Gillespie et al.1965, Lamb 1976), die Inkubation verläuft bei 37°C für 60 min. .
Nuclease S1 aus Aspergillus oryzae ist ein für Einzelstrang-RNA und Einzelstrang-DNA spezifisches Enzym. Der Nucleinsäureabbau erfolgt bei 30 mM Na-acetat pH 4,6 , 50 mM NaCl, 1 mM $ZnSO_4$ und 5% Glyzerin. Die Enzymzugabe hängt vom eingesetzten Substrat ab, daraus ergab sich für die meisten Ansätze eine Konzentration von 50 U/ml. Inkubiert wird für 60 min. bei

45°C (Vogt 1973). Da S1-Nuclease durch Formamid gehemmt wird, müssen Hybridisierungsansätze vor dem Verdau auf weniger als 5% Formamid verdünnt werden.
DNase I (RNase frei) spaltet Einzelstrang- und Doppelstrang-DNA. Die Reaktion verläuft in Gegenwart von 25 mM Mg-acetat bei 37°C für 60 min. . Der Standardansatz enthält 100 µg Enzym/ml.
Die Messung des Nuclease-resistenten Materials erfolgt, wie in 2.5.2. beschrieben, durch TCA-Fällung mit anschließender Messung der Radioaktivität.

2.8.3. Schmelzkurven

Die thermische Stabilität eines Hybrid-Moleküls steht in Beziehung zum Grad der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Nucleinsäuresträngen. So kann durch stufenweise Erhitzung des Hybrids und durch das damit verbundene Aufschmelzen der Partnerstränge eine qualitative Aussage über die vollständige Basenpaarung gemacht werden (Varmus 1973). Das zu untersuchende Hybrid wird in SSC-Puffer aufgenommen und in Aliquots von je 5 µl bei definierten Temperaturen für 2 min. erhitzt. Sofort anschließend gibt man zu der Probe 200 µl eiskalten Nuclease S1-Puffer und 5 U Nuclease S1 Enzym. Nach Inkubation von 60 min. bei 45°C wird die säurefällbare Aktivität bestimmt (2.5.2.).

2.9. Sicherheitsmaßnahmen bei Arbeiten mit Viren

Alle Arbeiten mit intakten Viruspartikeln bzw. mit virusinfizierten Zellkulturen werden in einem speziellen 'Viruslabor' durchgeführt, das baulich von den allgemeinen Labors abgetrennt ist und zu dem nur ein gewisser, autorisierter Personenkreis Zutritt hat. Das Labor ist mit allen erforderlichen Geräten und Maschinen ausgerüstet, die zur Viruszucht in Zellen und Eiern und zur Virusreinigung erforderlich sind.

Das Labor selbst wird 'sauber' gehalten, d.h. alle Arbeiten mit offenen Virussuspensionen etc. werden nur in sterilen Werkbänken durchgeführt. Alle benutzten Glaswaren und Geräte werden sofort noch innerhalb der Werkbank in Gefäße mit 2%iger Lösung des Desinfektionsmittels "Lorasol V" eingelegt. Diese Gefäße werden zusätzlich noch zusammen mit allem anderen im Labor anfallenden Abfall in großen Edelstahlbehältern autoklaviert. Das geschieht in einem speziell umgerüsteten Abtötungsautoklaven. Alle benutzten Geräte, z.B. Rotoren, Ständer etc., die nicht kontaminiert wurden, werden nach Beendigung eines Arbeitsganges vorsorglich desinfiziert. Aus Viren und Zellen wird noch innerhalb des Viruslabors die Nucleinsäure isoliert; nur diese darf dann in die biochemischen Labors gebracht werden.
Für das Personal gelten im Viruslabor die "Unfallverhütungsvorschriften für medizinische Laboratoriumsarbeiten von 1957". Als Schutzkleidung stehen grün gefärbte Kittel, die ebenfalls nach Gebrauch autoklaviert werden, sowie Einmalhandschuhe und Laborschuhe zur Verfügung. Vor Verlassen des Labors muß eine Händedesinfektion durchgeführt werden. Bei allen im Virus-Bereich Beschäftigten wird in regelmäßigen Abständen der Antikörper-Titer gegen die bearbeiteten Viren überprüft.

3. ERGEBNISSE

3.1. Ergänzende Vorarbeiten

Der Nachweis von 6/94 spezifischen Nucleinsäuren in den Fusionzellen sollte für RNA- und für DNA-Sequenzen durch Hybridisierung mit unterschiedlichen Nucleinsäureproben erfolgen, um als Hybridisierungsprodukte jeweils RNA/DNA Hybride zu erhalten.
Für den Nachweis von virusspezifischen RNA-Sequenzen in den Zellen wurde eine 6/94 ^{3}H-cDNA in die Hybridisierungsversuche eingesetzt. Die Synthesebedingungen für diese cDNA waren bereits im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit aufgestellt worden: Es konnte mit Hilfe des Enzyms 'Reverse Transcriptase' der Retro-Viren in einem in-vitro Ansatz eine basenkomplementäre DNA-Kopie an der RNA des Paramyxovirus 6/94 synthetisiert werden. Die Reaktionsbedingungen wurden optimiert sowie die Spezifität der ablaufenden Reaktion überprüft. Dabei zeigte sich, daß nur das Oligonucleotid oligo-dG als Primer-Molekül für die Reverse Transcription an 6/94 RNA wirkt; auf diesen Punkt wird in einem späteren Abschnitt noch ausführlich eingegangen. Die synthetisierte cDNA wurde durch enzymatischen Verdau auf ihren DNA-Charakter überprüft und durch Hybridisierungsexperimente mit viraler RNA in ihrer Spezifität bestätigt; der Sedimentationswert der cDNA betrug 2-12s (Neubert 1976).
Als Ergebnis dieser Arbeit stand eine hochmarkierte, virusspezifische cDNA zur Verfügung, mit deren Hilfe der Nachweis von virusspezifischen RNA-Sequenzen in den Fusionszellen begonnen werden sollte.
Zunächst wurden noch die Charakterisierungsmethoden für RNA/DNA Hybride verbessert, um bei den nachfolgenden Hybridisierungsversuchen möglichst präzise Aussagen zu erhalten. Im folgenden Abschnitt sind Charakterisierungsverfahren und die daraus resultierenden Aussagen für RNA/cDNA Hybride zusammengestellt.

3.1.1. Schärfere Nachweismethoden für RNA/cDNA Hybride

Die Cs_2SO_4-Dichtegradientenanalyse von Nucleinsäuren bzw. deren Hybridisierungsprodukten ergibt einige grundlegende und wichtige Aussagen:
Zunächst können die beiden Hybridisierungspartner einzeln auf ihre Schwimmdichte überprüft werden; die Analyse der Produkte einer RNA/cDNA Hybridisierung zeigt, ob eine Interaktion zwischen den Nucleinsäurespecies stattgefunden hat, da dabei die radioaktive Markierung der cDNA aus dem DNA Dichtebereich in Richtung RNA-Dichte verschoben wird. Aus dem Ausmaß der Verschiebung ist weiterhin abzuschätzen, ob die neugebildeten Nucleinsäurehybride zu gleichen Teilen aus RNA und DNA bestehen, oder ob eine Nucleinsäureart überwiegt. Keine Aussagen erhält man aus der Dichtegradientenanalyse darüber, ob es sich bei dem Hybrid um ein 'echtes' Hybrid, d.h. ein basengepaartes Hybrid handelt. Es ist möglich, daß die Nucleinsäuren nach Hybridisierung nur an den Enden über einige Nucleotide zusammenhängen, oder bei Basenpaarung an beiden Enden im Mittelteil ungepaarte Regionen bestehen; alle diese Ausprägungen, vom nichtgepaarten 'Pseudohybrid' bis zum vollständig gepaarten 'echten' Hybrid, bandieren bei der Dichtegradientenanalyse im gleichen Dichtebereich und sind nicht zu unterscheiden. In der linken Spalte der Abbildung 4 ist dieser Zusammenhang dargestellt.
Zur schärferen Charakterisierung der RNA/cDNA Hybride muß die Dichtegradientenanalyse mit einer weiteren Technik kombiniert werden, dem Nuclease S1 Verdau. Durch enzymatischen Verdau mit Nuclease S1, einem für DNA und RNA einzelstrangspezifischem Enzym, werden überstehende Einzelstrangbereiche und auch größere innenliegende, nicht basengepaarte Sequenzen der Hybride eliminiert. Übrig bleiben weitgehend gepaarte Hybride mit einem RNA:DNA Verhältnis von 1:1. Diese bandieren im Cs_2SO_4-Dichtegradienten im Bereich von 1,5 bis 1,55 g/cm^3. Nach Anwendung dieser kombinierten Analysen-Technik ist man weitgehend sicher, daß die im Gradienten gemessene Aktivität von basengepaarten Hybriden stammt. (Das hierzu gehörige

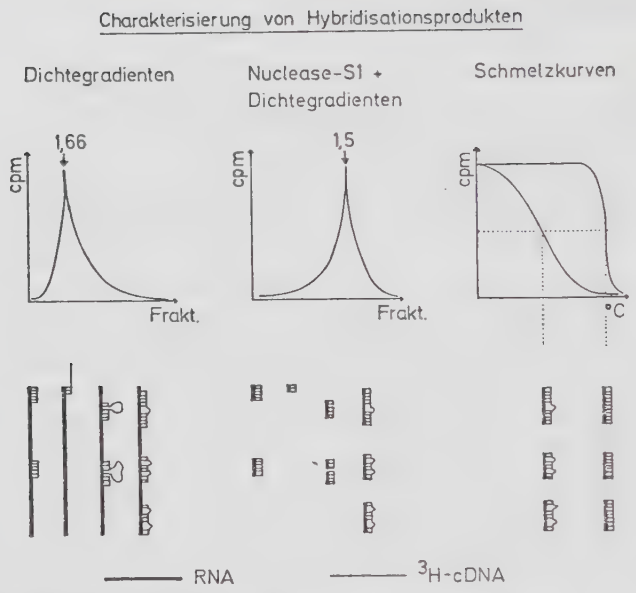


Abb. 4: Charakterisierung von Hybridisierungsprodukten durch verschiedene analytische Verfahren bzw. deren Kombination.

In der oberen Zeile sind die idealisierten Ergebnisse der analytischen Methoden abgebildet.
Die untere Zeile zeigt eine Auswahl von den jeweils möglichen Ausprägungen der Hybridisierungsprodukte.

Schema befindet sich in der mittleren Spalte der Abbildung 4).

Da die Nuclease S1 sehr kurze ungepaarte Sequenzen in Hybridmolekülen nicht erkennen und ausschneiden kann, muß, wenn eine noch exaktere Analyse erforderlich ist, eine weitere Technik eingesetzt werden: die Bestimmung des Schmelzpunktes des Hybrids (rechte Spalte in der Abbildung 4). Dazu werden die Hybride vor Nuclease S1 Verdau bei steigenden Temperaturen präinkubiert und dann die noch säurefällbare Radioaktivität bestimmt. Nicht vollständig gepaarte Hybride sind durch ihren niedrigeren Schmelzpunkt von ganz basengepaarten Hybriden zu unterscheiden. Wegen der genaueren Ablesbarkeit wird als Schmelzpunkt diejenige Temperatur bezeichnet, bei der noch

50% der Hybridaktivität Nuclease-resistent sind.
Voraussetzung für die Anwendung dieser schärferen Charakterisierungsmethoden auf RNA/cDNA Hybride ist, daß die cDNA vollständig sensitiv für Nuclease S1 ist. In dieser Beziehung ergaben sich noch einige Schwierigkeiten, die es erforderlich machten, die 6/94 cDNA Synthese in dieser Hinsicht zu optimieren.

3.1.2. Optimierung der 6/94 cDNA Synthese zur Erhöhung des einzelsträngigen Anteils

Zugabe von Act.D zum Reaktionsansatz hemmt die Entstehung von Doppelstrang cDNA bei der Reversen Transcription von viraler RNA (McDonnel et al.1970). Dies zeigt sich normalerweise in einem Abknicken der Syntheserate nach ungefähr 30 min.. Auch bei der Reversen Transcription von 6/94 RNA konnte dieser Act.D-Effekt nachgewiesen werden (Neubert 1976). Jedoch wurde auf eine Bestimmung des Anteils von doppelsträngiger 6/94 cDNA verzichtet.
Die Einführung des Nuclease S1 Verdaus zur Charakterisierung von Nucleinsäurehybriden machte es dann erforderlich, eine möglichst Doppelstrang-freie 6/94 cDNA bei den Versuchen einzusetzen. Eine Untersuchung der bisher synthetisierten 6/94 ^{3}H-cDNA ergab, daß darin bis zu 15% Nuclease S1-resistente Aktivität zu finden war. Erst durch Präinkubation der cDNA für 2 min. bei 100^{o}C konnte die S1-Resistenz auf ungefähr 2% gedrückt werden. Dieser Prozentsatz entspricht dem normalen Background des Nuclease S1 Systems.
Durch den hohen Doppelstrang Anteil in der 6/94 ^{3}H-cDNA wurde die Interpretation der ersten Hybridisierungsergebnisse stark erschwert. Die Abbildung 5 zeigt ein Beispiel hierfür.
Hier zeigt sich eine hohe Nuclease S1 resistente Aktivität im Dichtebereich bei 1,42-1,45 g/cm^{3}. Die Aktivität im Hybridbereich würde für sich gesehen auf eine Hybridisierung hinweisen; da jedoch im DNA-Bereich unerwartet eine hohe Nuclease-resistente Aktivität vorliegt, können die Hybrid-Counts

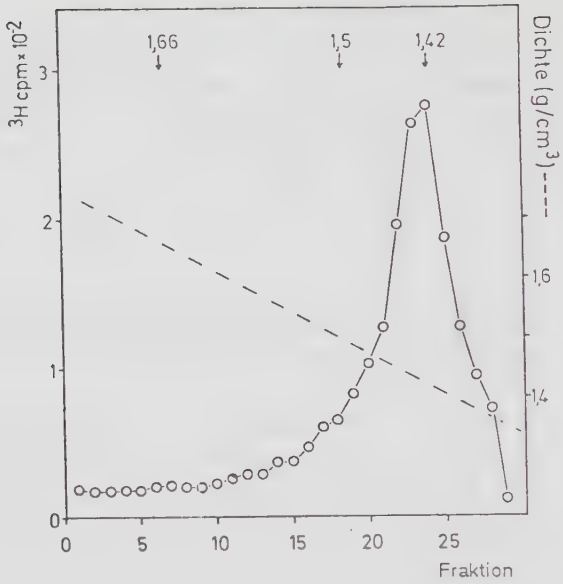


Abb. 5: Analyse der Hybridisierung von 6/94 ^{3}H-cDNA mit C1-C-2 gesamt-RNA nach Nuclease-S1-Verdau im Cs_2SO_4-Dichtegradienten.

100 µg RNA aus C1-C-2 Zellen wurden mit 25 000 cpm 6/94 ^{3}H-cDNA im Hybridisierungsansatz (2.7.) 24 Std. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz mit Nuclease-S1 verdaut (2.8.2.) und im Cs_2SO_4-Gradienten analysiert (2.8.1.). Angegeben ist die säurefällbare Radioaktivität von jeder Fraktion. Der Dichtegerade liegt die Bestimmung des Refraktionsindexes von jeder 3. Fraktion zugrunde.

auch als Schulter des DNA-Peaks interpretiert werden. Eine klare Aussage ist damit nicht möglich.
Weiterhin fällt bei diesem Gradientenprofil auf, daß die DNA Aktivität nicht bei 1,45 g/cm^3 bandiert, sondern in einem Bereich geringerer Dichte. Durch zwei weitere Dichtegradientenanalysen, nämlich 6/94 ^{3}H-cDNA nach Nuclease S1 Verdau und 6/94 ^{3}H-cDNA, hybridisiert mit unspezifischer RNA, nach Nuclease S1 Verdau, wurde dieses Ergebnis bestätigt. Die 6/94 cDNA Präparation enthielt folglich Doppelstrang-DNA.
Zwei Möglichkeiten für die Entstehung dieser ds-cDNA wurden in Betracht gezogen:

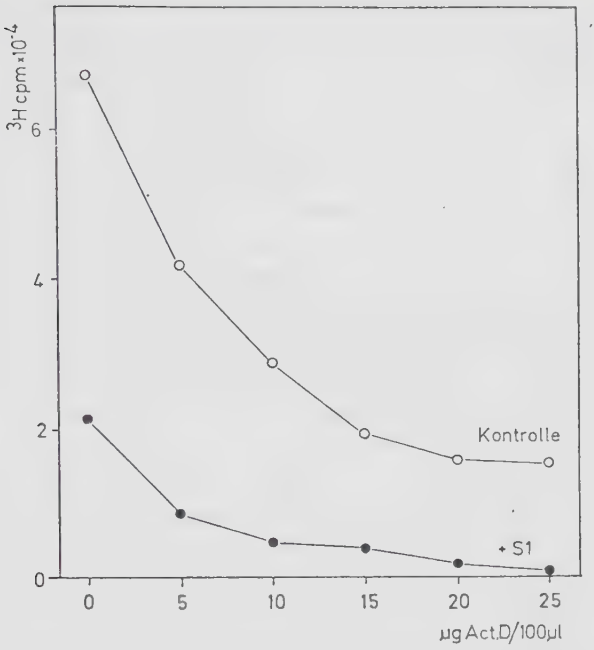


Abb. 6: Abhängigkeit der Nuclease-S1-Resistenz der gereinigten 6/94 cDNA von der Actinomycin D Konzentration bei der Synthese.

In Standard cDNA-Synthese Ansätze (2.5.1.) wurde Actinomycin D in den Konzentrationen 0, 5, 10, 15, 20 und 25 µg/100 µl eingesetzt und die Ansätze für 120 min. bei 42 °C inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde mit SDS/Phenol gereinigt, mit Alkohol gefällt und für 16 Std. bei 37 °C mit KOH verdaut (2.5.3.). Anschließend wurde je ein Parallelansatz mit Nuclease-S1 verdaut (2.8.2.) und das säurefällbare ^{3}H-dGMP in allen Proben bestimmt (2.5.2.). Offene Kreise: cDNA ohne Verdau, geschlossene Kreise: cDNA nach Nuclease-S1-Verdau. Aufgetragen ist die säurefällbare Radioaktivität gegen die Actinomycin D Konzentration im Ansatz.

1) Die Zugabe von Act.D zum Reaktionsansatz hemmt die Doppelstrangsynthese durch das Enzym nicht vollständig
2) Die 6/94 cDNA enthält wie die als Template dienende RNA eine hohe Sekundärstruktur, die von der Nuclease S1 nicht geschnitten werden kann

Zur Klärung dieser Frage wurde der Zusammenhang zwischen Act.D Konzentration im Syntheseansatz und Nuclease S1-Sensitivität

der synthetisierten cDNA gemessen. In Parallelansätzen wurde 6/94 ^{3}H-cDNA synthetisiert, gereinigt und jeweils ein Ansatz mit Nuclease S1 verdaut. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in der Abbildung 6 dargestellt.
Der Versuch zeigt, daß durch steigende Act.D Konzentration im Ansatz die Syntheserate der 6/94 ^{3}H-cDNA stark zurückgeht. Gleichzeitig verringert sich aber auch der Anteil an Nuclease S1 resistenter cDNA. Hieraus ergibt sich, daß für die hohe Nuclease-Resistenz der früher synthetisierten cDNA in erster Linie eine ungenügende Hemmung der Doppelstrang-Aktivität der Reversen Transcriptase durch Act.D verantwortlich war. Durch geeignete Wahl der Act.D Konzentration konnte die Nuclease S1 Sensitivität der synthetisierten cDNA in den folgenden präparativen Ansätzen auf 98% gesteigert werden.
Damit war die Optimierung der 6/94 cDNA Synthese abgeschlossen und es konnte die präparative Synthese von cDNA und deren Charakterisierung folgen.

3.1.3. Präparative Synthese, Reinigung und Charakterisierung der 6/94 ^{3}H-cDNA

Für die präparative Synthese von 6/94 ^{3}H-cDNA wurden Ansätze mit dem 5-fachen Volumen des in 2.5.1. beschriebenen Standardansatzes verwendet; als RNA-Template wurde gereinigte 6/94 50s RNA eingesetzt (2.3.3.). Die Inkubation des Syntheseansatzes erfolgte für 60 min. bei 42°C.
Im Folgenden ist die Reinigung und Charakterisierung einer Standardpräparation von 6/94 ^{3}H-cDNA beschrieben:
Nach Ablauf der Inkubation wurde die Gesamtsynthese durch Messung eines 10 µl Aliquots bestimmt (2.5.2.). Dann folgte die in 2.5.3. beschriebene zweimalige SDS/Phenol Extraktion mit anschließender Alkoholfällung. Nach Abzentrifugieren der gefällten Nucleinsäure wurde das Pellet in Puffer aufgenommen und in einem Aliquot die säurefällbare Radioaktivität bestimmt. Die Reinigung bis zu diesem Schritt ist in der Tabelle 3 zusammengefaßt. Dabei zeigt sich, daß während der Reinigung ein Teil der Aktivität verloren geht, hauptsächlich in der

Reinigungsschritt		^{3}H-dGMP-cpm	%
Gesamtsynthese		759.000	100,0
1.Phenolisation	Phenolphase	76.000	90,1
	wässr.Phase	667.000	87,8
2.Phenolisation	Phenolphase	35.000	83,2
	wässr.Phase	597.000	78,6
nach der Alkoholfällung		542.000	71,4

Tab. 3: Verluste bei der Reinigung der 6/94 ^{3}H-cDNA bis zum Alkali-Verdau. Aufgeführt sind die einzelnen Reinigungsstufen mit den zugehörigen gesamt-Aktivitäten. Diese sind durch Messung von Aliquots (2.5.2.) und Umrechnung auf das Gesamtvolumen bestimmt.

ersten SDS/Phenol Behandlung.

Es folgte die alkalische Hydrolyse der Template-RNA in 0,3 M KOH für 24 Std. bei 25°C (2.5.3.). Anschließend wurde die cDNA neutralisiert und in Aliquots zu je 10.000 cpm bei -20°C eingefroren gelagert.

Nun begann die Charakterisierung der gereinigten 6/94 ^{3}H-cDNA. Als erstes wurde das Verhalten der cDNA gegenüber RNase, DNase und S1 Nuclease untersucht. Die Tabelle 4 zeigt das Ergebnis der verschiedenen enzymatischen Verdaus. Danach ergibt sich,

unbehandelt	2607 cpm	100,0%
RNase-Verdau	2664 cpm	102,5%
DNase-Verdau	151 cpm	5,8%
S1-Nuclease-Verdau	69 cpm	2,6%

Tab. 4: Enzymatischer Verdau der gereinigten 6/94 ^{3}H-cDNA mit RNase A, DNase I und S1-Nuclease aus Aspergillus oryzae.

Je 5 µl (ungefähr 2 500 cpm) gereinigte 6/94 ^{3}H-cDNA wurden in Parallelansätzen mit 20 µg/ml RNase A, oder mit 100 µg/ml DNase I bei 25 mM Mgac, oder mit 0,1 U S1-Nuclease für 60 min. bei 37 °C bzw. 45 °C verdaut. Anschließend wurde die säurefällbare Radioaktivität bestimmt (2.5.2.) und zu einem unverdauten Aliquot cDNA in Bezug gesetzt. Die Aktivität dieses Aliquots wurde als 100 % festgelegt. Angegeben ist die säurefällbare Radioaktivität nach Nucleaseverdau.

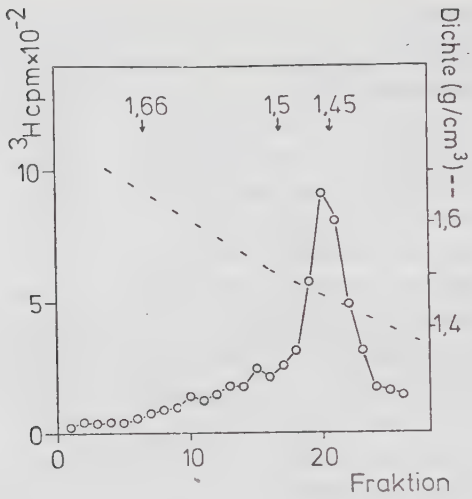


Abb. 7: Analyse der gereinigten 6/94 ^{3}H-cDNA im Cs_2SO_4-Dichtegradienten.

15 µl (ungefähr 7 500 cpm) gereinigte 6/94 ^{3}H-cDNA wurden mit 100 µg t-RNA gemischt und im Cs_2SO_4-Dichtegradienten die Schwimmdichte ermittelt (2.8.1.). Aufgetragen ist die säurefällbare Aktivität (2.5.2.) von jeder Fraktion. Die Dichtegerade wurde durch Messung der Refraktionswerte der Fraktionen ermittelt (2.8.1.).

daß es sich bei der synthetisierten und gereinigten cDNA um eine einzelsträngige DNA handelt. Durch Zusatz von RNase wird die cDNA nicht angegriffen, während durch DNase-Verdau der Anteil der TCA-fällbaren cpm, d.h. der Anteil der unverdauten DNA Moleküle auf 5,8% zurückgeht. Bei enzymatischem Verdau mit der einzelstrangspezifischen Nuclease S1 zeigt sich, daß die cDNA vollständig als Einzelstrang vorliegt. Die dabei verbleibenden 69 cpm (entsprechend 2,6%) müssen als Background dieses Systems angesehen werden.

Als weitere Charakterisierung und zum Vergleich mit den späteren Hybridisierungen wurde die Position der 6/94 ^{3}H-cDNA im Cs_2SO_4-Dichtegradienten untersucht. Dieser Gradient ist in der Abbildung 7 dargestellt.

Die Position der 6/94 cDNA im Dichtegradienten bestätigt die Ergebnisse der enzymatischen Verdaus: Die cDNA erweist sich

als einzelsträngige DNA mit einer Schwimmdichte von 1,45 g/cm^3.

Als weitere Kontrolle wurde in einem Parallelversuch ein Aliquot 6/94 ^{3}H-cDNA im Hybridisierungsansatz inkubiert, anschließend mit Nuclease S1 verdaut und im Dichtegradienten analysiert. Es konnte lediglich über den gesamten Gradienten verteilt eine Background-Aktivität von 10-35 cpm pro Fraktion gemessen werden.

Dieses Ergebnis ist für die Interpretation und Beurteilung von späteren Versuchen wichtig. Es zeigt, daß es bei Selbsthybridisierung von 6/94 cDNA zu keiner Doppelstrang Bildung kommt. Durch Nuclease S1 Verdau kann die gesamte cDNA verdaut werden, d.h. bei Auftreten von Nuclease-resistentem Material nach Hybridisierungen kann man davon ausgehen, daß diese Aktivität auf eine Interaktion der Hybridisierungspartner zurückzuführen ist.

Zur allgemeinen Charakterisierung der 6/94 ^{3}H-cDNA gehört noch die Angabe der spezifischen Aktivität. Diese berechnet sich aus der spezifischen Aktivität des verwendeten ^{3}H-dGTPs, in diesem Fall 13 Ci/mMol, 0,5 mCi/ml, aus der Zählausbeute des Szintillationszählers von 500.000 cpm/ 1 µCi und dem typischen dNMP-Gewicht von 308,75 gr./Mol. Daraus resultiert für die 6/94 ^{3}H-cDNA eine spezifische Aktivität von 6,32x10^6 cpm pro µg cDNA, oder von 6320 cpm / ng cDNA.

Als Voraussetzung für die Verwendung der 6/94 cDNA in Hybridisierungsexperimenten muß abschließend noch ihre Spezifität bewiesen werden. Die dazu erforderlichen Versuche sind in den nächsten Abschnitten beschrieben.

3.1.4. Nachweis der Spezifität der 6/94 cDNA durch Rückhybridisierung mit viraler RNA

Den Nachweis für die Spezifität einer in-vitro synthetisierten cDNA erbringt allein ihre Rückhybridisierung mit der RNA, die bei der Synthese als Matrize gedient hat. Der positive Ausgang eines solchen Versuches war eine weitere Voraussetzung dafür, die synthetisierte 6/94 ^{3}H-cDNA als spezifische

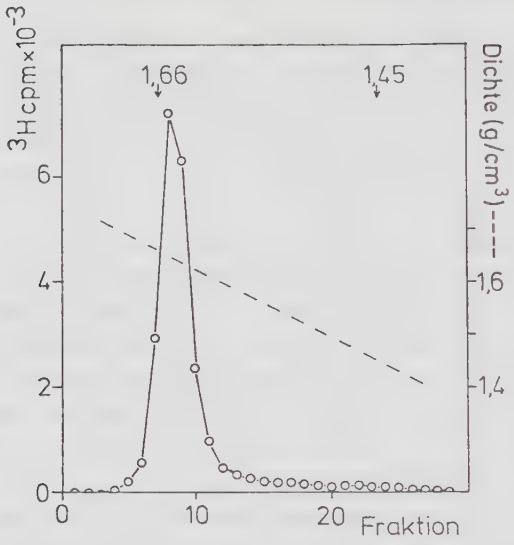


Abb. 8: Rückhybridisierung von 6/94 RNA mit 6/94 ^{3}H-cDNA und Analyse der Produkte im Cs_2SO_4-Dichtegradienten.

15 µl (ungefähr 30 000 cpm) gereinigte 6/94 ^{3}H-cDNA wurden mit 2 µg 6/94 RNA im Hybridisierungsansatz (2.7.) für 24 Std. bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Hybridisierungsprodukte im Cs_2SO_4-Dichtegradienten (2.8.1.). Aufgetragen ist die säurefällbare Aktivität von jeder Fraktion (2.5.2.) sowie die aus den Refraktionswerten errechnete Dichtegerade (2.8.1.).

Probe bei der Suche nach viralen RNA-Sequenzen in Zellen einsetzen zu können. Die Abbildung 8 zeigt die Analyse der Rückhybridisierung.

Die gesamte Aktivität ist in einem scharfen Peak im Dichtebereich bei 1,66 g/cm^3 zu finden. Folglich hat zwischen der langen viralen RNA (50s) und der kurzen 6/94 ^{3}H-cDNA eine Hybridisierung stattgefunden. Aufgrund der stark unterschiedlichen Länge der beiden Nucleinsäuren ergibt sich die korrespondierende Dichte der Hybridmoleküle nahe dem RNA-Bereich bei 1,66 g/cm^3 und nicht in einem mittleren Dichtebereich um 1,5 g/cm^3.

Als Aussage aus diesem Versuch ist festzuhalten, daß die cDNA

mit der homologen RNA unter Hybridisierungsbedingungen reagiert. Durch entsprechende Kontrollversuche muß allerdings noch nachgewiesen werden, daß das entstandene Produkt ein basengepaartes Hybrid ist.

3.1.5. Kritische Analyse des 6/94 Rückhybrids

Die im Abschnitt 3.1.1. beschriebenen Analyseverfahren wurden nun auf das Rückhybrid aus 6/94 ^{3}H-cDNA und und 6/94 viraler RNA angewandt. Damit sollten zugleich Vergleichskriterien für die Beurteilung der Hybridisierungsprodukte aus zellulärer Gesamt-RNA und 6/94 cDNA geschaffen werden.
In einem Parallelansatz zu dem in 1.1.4. beschriebenen Versuch wurde 6/94 RNA mit 6/94 cDNA hybridisiert, anschließend einem Nuclease S1 Verdau unterzogen und im Dichtegradienten analysiert. Das Resultat dieses Versuches zeigt die Abbildung 9.
Im Vergleich mit dem in Abbildung 8 dargestellten Gradienten sieht man, daß die Hauptaktivität, die sich vor Nuclease S1 Verdau im RNA-Dichtebereich bei 1,66 g/cm^{3} befand, nun in den Bereich bei 1,5 g/cm^{3} verlagert ist. Daraus folgt, daß von den Hybridmolekülen, die wegen ihres hohen RNA-Anteils im höheren Dichtebereich bandierten, alle einzelsträngigen Sequenzen durch den enzymatischen Verdau abgeschnitten worden sind. Als Ergebnis liegen doppelsträngige, Nuclease S1-stabile Hybride mit einer Schwimmdichte von 1,5 g/cm^{3} vor. Die Gesamtaktivität ist durch den Verdau nicht merklich verringert worden, d.h. die 6/94 ^{3}H-cDNA hat vollständig mit der viralen RNA hybridisiert. Damit ist eine erste entscheidende Aussage über die Basenkomplementarität der 6/94 cDNA und damit auch über ihre Spezifität gemacht.
Der endgültige Nachweis für die Spezifität der 6/94 cDNA ergibt sich aus dem in Abbildung 10 gezeigten Schmelzprofil des Rückhybrids.
Bei Erhitzen des Rückhybrids aus 6/94 RNA und 6/94 ^{3}H-cDNA zeigt sich nach Überschreiten von 80^{0}C eine zunehmende Sensi-

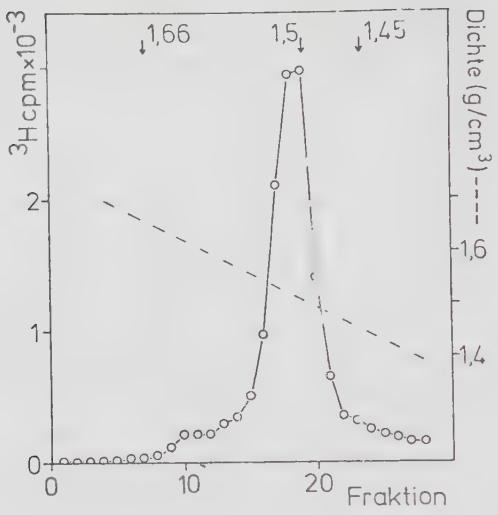


Abb. 9: Analyse des Rückhybrids aus 6/94 viraler RNA und 6/94 ^{3}H-cDNA nach Nuclease-S1-Verdau im Dichtegradienten.

10 µl (ungefähr 20 000 cpm) gereinigte 6/94 ^{3}H-cDNA wurden mit 2 µg 6/94 viraler RNA im Hybridisierungsansatz (2.7.) für 24 Std. bei 37 °C inkubiert und dann mit 1 U Nuclease-S1 in S1-Puffer für 60 min. bei 45 °C verdaut (2.8.2.). Anschließend wurde der Ansatz im Cs_2SO_4-Dichtegradienten analysiert (2.8.1.). Angegeben ist die säurefällbare Aktivität von jeder Fraktion (2.5.2.) sowie die aus den Refraktionswerten errechnete Dichtegerade (2.8.1.).

tivität gegenüber Nuclease S1. Der Schmelzpunkt ist mit 90-91°C anzugeben. Damit erweist sich das 6/94 Rückhybrid als stabiles Hybrid, in welchem heteropolymere Basensequenzen in korrekter Paarung vorliegen.

Damit ist bewiesen, daß es sich bei der in-vitro synthetisierten 6/94 ^{3}H-cDNA um eine basenkomplementäre DNA-Kopie der 6/94 RNA handelt. Diese cDNA kann nun als hochspezifische Probe zum Nachweis von 6/94 spezifischen Nucleinsäuresequenzen in den drei Fusionszell-Linien eingesetzt werden.

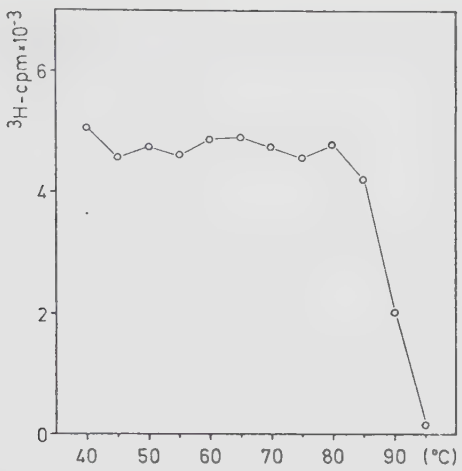


Abb. 10: Schmelzkurve des Rückhybrids aus 6/94 viraler RNA mit 6/94 ^{3}H-cDNA.

20 µl (ungefähr 80 000 cpm) gereinigte 6/94 ^{3}H-cDNA wurden mit 2 µg viraler 6/94 RNA im Hybridisierungsansatz (2.7.) für 24 Std. bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Hybride unter Zusatz von 50 µg t-RNA mit 2,5 Volumen Äthanol und 300 mM NaCl bei -20 °C ausgefällt. Die gefällten Nucleinsäuren wurden abzentrifugiert, getrocknet und in SSC 1x aufgenommen. Pro Meßpunkt der Schmelzkurve wurden 10 µl (ungefähr 5 000 cpm) Rückhybrid in Eppendorfgefäßen für 2,5 min. bei den angegebenen Temperaturen erhitzt (Temperaturschwankung ±0,5 °C). Dann wurden schnell 200 µl eiskalter S1-Puffer mit 0,5 U S1-Nuclease zu der erhitzten Probe gegeben und der S1-Verdau für 60 min. bei 45 °C inkubiert. Anschließend wurde die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (2.5.2.). Angegeben ist die Nuclease-S1 resistente Aktivität des Hybrids in Abhängigkeit von der Temperatur.

3.2. Nachweis von 6/94 spezifischer RNA in den drei Fusions-Zell-Klonen mit Hilfe der 6/94 ^{3}H-cDNA

Die hochmarkierte 6/94 spezifische cDNA wurde nun in Hybridisierungsversuchen zum Nachweis von virusspezifischen RNA-Sequenzen in den drei Fusionszell-Klonen eingesetzt.
Diese Zell-Linien hatten nach ihrer Isolierung unterschiedliche Werte im HAD-Test und in der Immunfluoreszenz erbracht. Ein solches Ergebnis war überraschend, da alle drei Klone von derselben Gewebeprobe abstammten. Eine Vermutung dazu war, die unterschiedlich ausgeprägte Produktion von virusspezifischen Proteinen könne mit dem latenten Zustand der Viren in den Zellen zusammenhängen. Deshalb wurden die drei Zellklone nun auf 6/94 spezifische Nucleinsäuren überprüft mit der Hoffnung, durch den Nachweis von viraler RNA Hinweise auf das Vorhandensein von latenten Viren zu erhalten.

3.2.1. Hybridisierung von 6/94 ^{3}H-cDNA mit gesamt-RNA aus den drei Fusionszell-Linien

Untersucht wurden die drei Fusionszell-Klone Cl-E-8, Cl-F-2 und Cl-C-2, deren Isolierung in der Einleitung ausführlich beschrieben wurde.
Der Klon Cl-E-8, dessen Zellen sich im HAD- und IF-Test fast zu 100% positiv verhielten, müßte alle virusspezifischen RNA-Species enthalten und bei Hybridisierung mit der 6/94 ^{3}H-cDNA zu stabilen RNA/cDNA Hybriden führen. Er stellt somit eine Positiv-Kontrolle für das Nachweissystem dar.
Das eigentliche Interesse konzentrierte sich auf die beiden Zell-Klone Cl-F-2 und Cl-C-2. Bei diesen Klonen waren HAD- und IF-Test schwach positiv bzw. vollständig negativ. Da die Stammzellen dieser Klone aus der gleichen Gewebeprobe stammten wie die des virusproduzierenden Klons Cl-E-8, war anzunehmen, daß diese beiden Zell-Linien ebenfalls virusspezifische Information enthielten, deren Expression aber teilweise oder gänzlich blockiert war. Diese provirale RNA sollte nun durch die Hybridisierung mit 6/94 ^{3}H-cDNA nachgewiesen werden.

Zu diesem Zweck wurden von allen drei Fusions-Linien Zellen vermehrt und aus ihnen die zelluläre Gesamt-RNA extrahiert. Diese wurde gereinigt und mit 6/94 ^{3}H-cDNA hybridisiert. Die Analyse der Hybridisierungsansätze zeigen die Abbildungen 11 bis 13.

Die Hybridisierung von RNA aus Cl-E-8 Zellen mit 6/94 ^{3}H-cDNA zeigt ein klares Ergebnis: Die gesamte Aktivität ist aus dem DNA-Bereich bei 1,45 g/cm^{3} in Richtung Hybrid- und RNA-Dichtebereich verschoben. Außer dem Hauptpeak bei 1,66 g/cm^{3}, bei dem lange virale 50s RNA mit der kürzeren cDNA hybridisiert hat, gibt es noch einen Nebengipfel im Dichtebereich für 1:1 Hybride bei 1,5 g/cm^{3}. Hieraus kann man schließen, daß entweder in Cl-E-8 Zellen eine zweite kürzere, virusspezifische RNA in signifikanten Mengen vorhanden ist, oder daß bei der Präparation die virale RNA entsprechend degradiert wurde. Da der zweite Peak im Bereich von 1,5 g/cm^{3} bei mehreren Wiederholungen dieses Experiments immer wieder auftrat, auch mit RNA aus neuen Isolationen, kann man eine Degeneration der virusspezifischen RNA bei der Isolierung von gesamt-RNA aus Cl-E-8 Zellen weitgehend ausschließen. Eher kommt in Betracht, daß bei RNA-Präparationen aus Cl-E-8 Zellen, bedingt durch die hohe Infektionsrate dieser Zellen, ein größerer Anteil an virusspezifischer hoch- und niedermolekularer RNA isoliert wird. Bereits 1970 wurde gezeigt,(Kingsbury et al. 1970), daß bei Sendai Viren, analog zu den inkompletten Viruspartikeln bei Influenza (von Magnus 1954), unvollständige Viruspartikel mit einer RNA von niedrigem Molekulargewicht auftreten. Auch beim 6/94 Virus wurde solche niedermolekulare RNA beschrieben (Lewandowski et al.1976), durch deren Beteiligung man die Entstehung von Hybriden mit einer Dichte von 1,5 g/cm^{3} erklären könnte.

Bei der Hybridisierung von 6/94 ^{3}H-cDNA mit RNA aus Cl-F-2 Zellen, bei denen nur ein geringer Teil positiv auf die virusspezifischen Tests reagiert, ist das Ergebnis ebenso eindeutig ausgefallen. Die Aktivität ist in einem scharfen Peak im RNA-Bereich bei 1,66 g/cm^{3} konzentriert. Das bedeutet wiederum, daß die vorliegenden Hybride einen weit größeren RNA- als

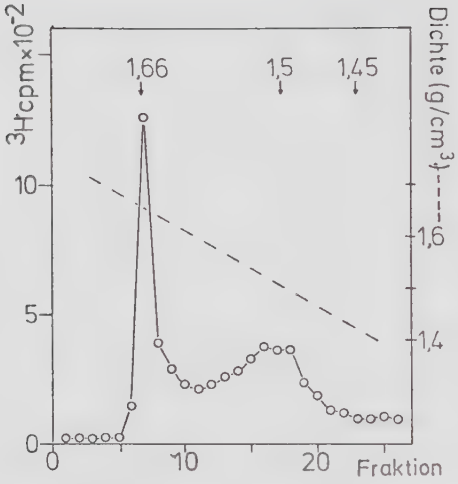


Abb. 11 : Analyse einer Hybridisierung von RNA aus human Gehirn/Affennieren Fusionszellen Klon C1-E-8 mit in vitro synthetisierter 6/94 ^{3}H-cDNA im Cs_2SO_4-Gradienten.

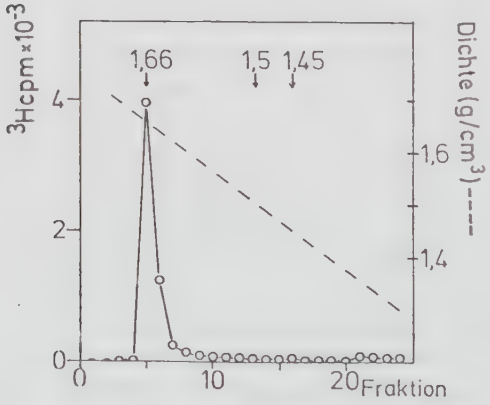


Abb. 12: Analyse einer Hybridisierung von RNA aus human Gehirn/Affennieren Fusionszellen Klon C1-F-2 mit in vitro synthetisierter 6/94 ^{3}H-cDNA im Cs_2SO_4-Gradienten.

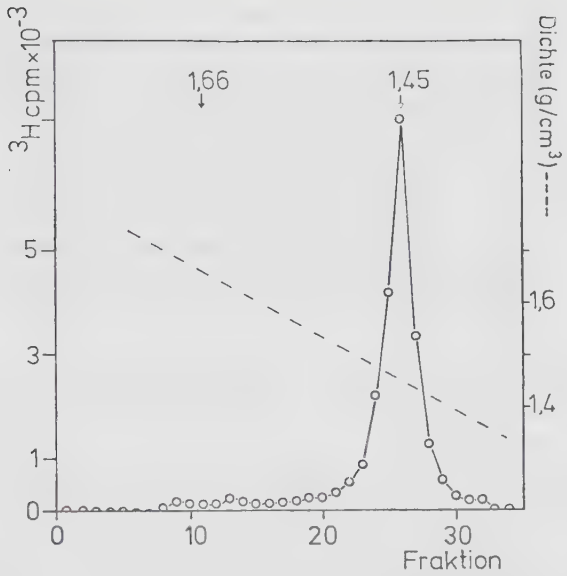


Abb. 13: Analyse einer Hybridisierung von RNA aus human Gehirn/Affennieren Fusionszellen Klon C1-C-2 mit in vitro synthetisierter 6/94 ^{3}H-cDNA im Cs_2SO_4-Gradienten.

Fusionszellen aller drei Zellklone wurden in MEM-F 15 Medium mit Antibiotika-Zusatz und 10% FKS unter 5% Co_2 bei 33°C gezüchtet. Nachdem sich der Zellrasen in den Rouxflaschen weitgehend geschlossen hatte, wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums mit Pbs^- gewaschen und in Pbs^- mit Hilfe eines Teflonschabers abgekratzt. Durch niedertourige Zentrifugation in der Christzentrifuge bei 1000 rpm, 4°C für 10 min. wurden die Zellen sedimentiert. Die typische Ausbeute betrug 0,6 g Zellen pro 1000 cm^2 Kulturfläche. Durch Inkubation mit hypotonischem Lysopuffer (2 ml/ 1g Zellen) wurden die Zellen im Eisbad osmotisch geöffnet. Nach 20-fachem Homogenisieren mit einem Glas-Douncer "S" wurde 1/10 Volumen des Puffers "Z" zugegeben und Zellkerne und Mitochondrien durch Zentrifugation im SS 34 Rotor der Sorvall-Zentrifuge bei 10.000 g, 4°C für 20 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und SDS bis zu einer Endkonzentration von 1% zugegeben. Dann wurde mit einem Volumen puffergesättigtem, neutralisiertem Phenol kräftig gemischt. Die Phasentrennung erfolgte in der Christzentrifuge bei 3.000 rpm für 5 min. bei Zimmertemperatur. Die wässrige Phase wurde abgenommen und noch zweimal der gleichen SDS/ Phenolbehandlung unterzogen. Aus der letzten wässrigen Phase wurde dann mit 2,5 Volumen reinem Äthanol in Gegenwart von 300 mM NaCl die RNA in der Kälte bei -20°C gefällt. Nach Pelletieren und Trocknen wurde die gefällte RNA wieder gelöst. Die Alkoholfällungen wurden solange fortgeführt, bis sich ein einwandfreies Spektrum im UV-Bereich ergab. Die RNA wurde unter Alkohol bei -20°C

aufbewahrt.
Für die Hybridisierung wurden in Parallelversuchen je 300 µg der drei zellulären RNAs aus den Fusionszellen mit rund 80.000 cpm gereinigter 6/94 ^{3}H-cDNA im Hybridisierungsansatz (100 µl) in Gegenwart von 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 und 50% Formamid für 24 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl des Hybridisierungsansatzes mit 100 µg t-RNA und 8 ml Cs_2SO_4 Lösung in STE-Puffer, Ausgangsdichte 1,55 g/cm^3 gemischt und im Rotor Ti 50 einer Beckman Ultrazentrifuge bei 15°C 66 Std. mit 43.000 rpm zentrifugiert. Dann wurde der Gradient von unten her fraktioniert und die säurefällbare Radioaktivität bestimmt (2.5.2.). Aus den Refraktionswerten der Fraktionen wurde die Dichtegerade errechnet (2.8.1.). Angegeben ist die säurefällbare Aktivität der einzelnen Fraktionen sowie die Dichtegerade.

DNA-Anteil enthalten, die cDNA hat an die lange virale RNA gebunden. Auch diese Zellen enthalten also hochmolekulare 6/94 spezifische RNA.
Von besonderem Interesse ist die Frage nach 6/94 spezifischer RNA in den Cl-C-2 Zellen. Sie enthalten nach den Hämadsorptions- und Immunfluoreszenz-Daten keine virusspezifischen Proteine, weder auf der Zelloberfläche noch im Zytoplasma (Koprowski et al.1975). Es wäre aber durchaus denkbar, daß diese Zellen eine inaktive 6/94 RNA enthalten, da sie aus der gleichen Zellpopulation wie die beiden anderen Klone stammen.
Die Hybridisierung von Cl-C-2 RNA mit 6/94 ^{3}H-cDNA ergibt nach Dichtegradientenanalyse kein eindeutiges Bild. Es zeigt sich eine Konzentrierung der Hauptaktivität auf den DNA-Bereich bei 1,45 g/cm^3; dies würde bedeuten, daß keine Hybridisierung stattgefunden hat. Da man aber in diesen Zellen u.U. mit sehr wenig virusspezifischer RNA rechnen sollte, müssen auch geringe Hybridaktivitäten berücksichtigt werden. Die Fraktionen 1-7 zeigen typische Background-Aktivität von 20-50 cpm; zwischen Fraktion 9 und 20 liegen die meßbaren Counts deutlich höher, bei ungefähr 150 bis 280 cpm. In wieweit man dies als eine erfolgte Hybridisierung ansehen kann, oder als Schulter des DNA-Peaks interpretieren muß, ist durch diesen Versuch nicht eindeutig zu klären und muß durch eine schärfere Charakterisierung der Hybride entschieden werden.

3.2.2. Schärfere Charakterisierung der Hybride aus Fusions-Zell RNA und 6/94 ^{3}H-cDNA

Anknüpfend an die aufgestellten Kriterien für die Charakterisierung von Hybrid-Molekülen (3.1.1.) wurden die Reaktionsprodukte aus RNA der drei Fusionszell-Klone und 6/94 cDNA einer erweiterten Hybrid-Analyse unterzogen.
Zwei Fragen sollten dabei beantwortet werden:
1) Handelt es sich bei diesen Hybriden um Nuclease S1 - resistente Doppelstrangstrukturen und ist ihr Schmelzpunkt, bedingt durch korrekte Basenpaarung, mit dem des Rückhybrids vergleichbar?
2) Lassen sich nach Nuclease Verdau der überschüssigen, nichtgebundenen ^{3}H-cDNA bei der Hybridisierung mit RNA aus Cl-C-2 Zellen klare Aussagen darüber gewinnen, ob diese Zellen virusspezifische RNA enthalten und können die Ergebnisse in Einklang gebracht werden mit den Resultaten des HAD- bzw. IF-Tests?
Zur Klärung dieser Fragen wurden Parallelansätze der drei Hybridisierungen mit Nuclease S1 verdaut und dann die Schwimmdichten der Nuclease-resistenten Hybride bestimmt. Die Abbildungen 14 bis 16 zeigen die Dichtegradientenprofile dieser Versuche.
Nach Nuclease Verdau ergibt sich beim Nucleinsäurehybrid aus Cl-E-8 RNA und 6/94 cDNA eine Verschiebung der Aktivität zum Dichtebereich bei 1,5 g/cm^{3}. Die Veränderung der Schwimmdichte ist mit dem Entfernen von überstehender viraler RNA zu erklären. Es bilden sich aus 6/94 ^{3}H-cDNA und gesamt-RNA von Cl-E-8 Fusionszellen Nuclease S1-resistente, d.h. basengepaarte Hybride. Cl-E-8 Zellen enthalten folglich 6/94 spezifische RNA. Diese Aussage war zu erwarten, da die Hybridisierungen mit Cl-E-8 RNA als positive Kontrolle des Nachweissystems dienen sollten.
Die Hybride aus Cl-F-2 RNA und 6/94 cDNA sind ebenfalls Nuclease S1 stabil; auch bei diesen Hybriden werden überstehende Einzelstrangenden durch die Nuclease abverdaut und die resistenten Hybridmoleküle bandieren im Dichtebereich bei 1,5 g/cm^{3}.

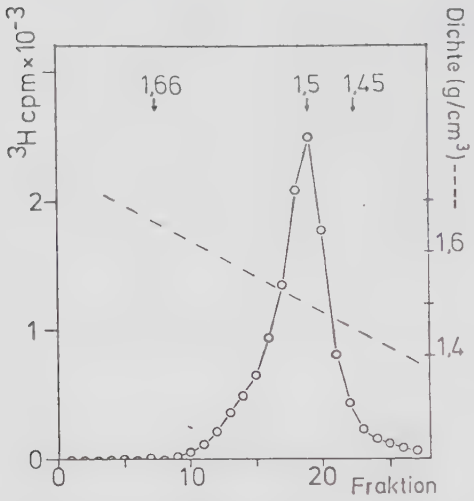


Abb. 14: Bestimmung der Schwimmdichte von Nuclease-S1 verdauten Hybriden aus 6/94 ^{3}H-cDNA und RNA von Cl-E-8 Fusionszellen im Cs_2SO_4-Gradienten.

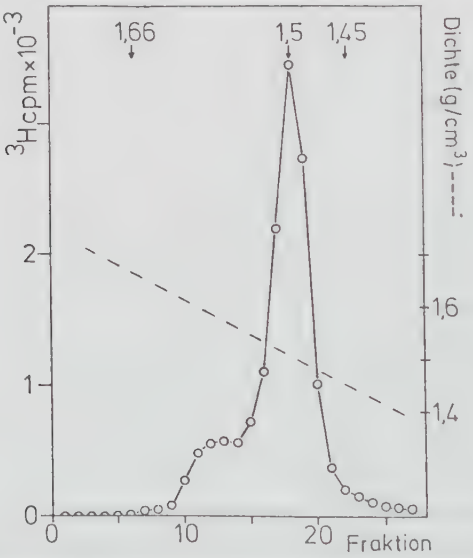


Abb. 15: Bestimmung der Schwimmdichte von Nuclease-S1 verdauten Hybriden aus 6/94 ^{3}H-cDNA und RNA von Cl-F-2 Fusionszellen im Cs_2SO_4-Gradienten.

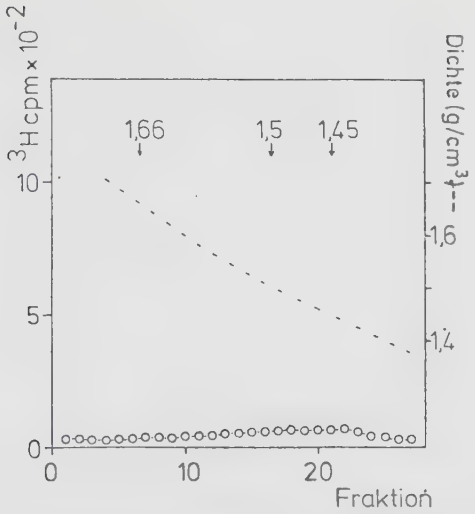


Abb. 16: Analyse des Hybridisierungsproduktes von 6/94 ^{3}H-cDNA mit RNA aus Cl-C-2 Fusionszellen nach Nuclease-S1-Verdau im Cs_2SO_4-Gradienten.

Aus den Hybridisierungsansätzen der drei Fusionszell-RNA Spezies mit 6/94 ^{3}H-cDNA (siehe Legende zu Abb. 13) wurden nach 24 Std. Inkubation bei 37 °C je 30 µl entnommen. Zu diesen Aliquots wurden je 300 µl S1-Puffer mit 5 U S1-Nuclease zugegeben und 60 min. bei 45 °C inkubiert. Dann wurde jeder Ansatz zweimal mit SDS/Phenol von Proteinen gereinigt und die letzte wässrige Phase nach Zusatz von 100 µg t-RNA mit 2,5 Volumen Äthanol in 300 mM NaCl bei -20 °C gefällt. Die gefällten Nucleinsäuren wurden abzentrifugiert, getrocknet und in 100 µl SSC aufgenommen. Nach Mischen mit 8 ml Cs_2SO_4-Lösung in STE, Dichte 1,55, wurden die Proben im Ti 50 Rotor 66 Std. bei 15 °C, 43 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Gradienten von unten angestochen und fraktioniert. Angegeben ist die säurefällbare Radioaktivität von jeder Fraktion (2.5.2.) sowie die aus den Refraktionswerten errechnete Dichtegerade (2.8.1.).

Quantitative Unterschiede zur Hybridisierung mit Cl-E-8 RNA sind nicht zu erkennen: Summiert man die Aktivität in den Peaks der Gradienten auf, so ist sie gleich groß, eine Streubreite der Versuche von 10% vorausgesetzt. Auch die aus den Schmelzprofilen (Abb.17) abgeleiteten Schmelzpunkte für Cl-E-8 Hybride von 90°C und für Cl-F-2 Hybride von 89°C liegen in der Fehlerbreite der Experimente und sind nicht signifikant unterschiedlich.

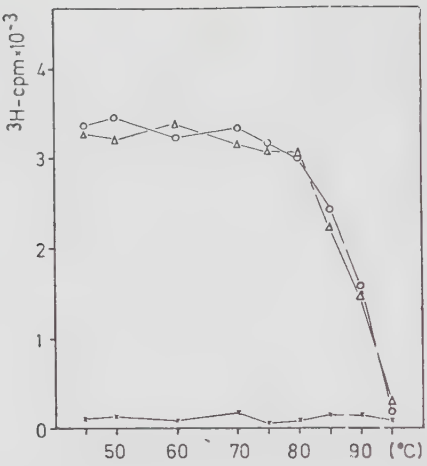


Abb. 17: Schmelzprofile von Nucleinsäurehybriden aus 6/94 ^{3}H-cDNA und RNA aus den drei Fusionszell-Linien Cl-E-8, Cl-F-2 und Cl-C-2.

Aus den Hybridisierungsansätzen der drei Fusionszell-RNA Spezies mit 6/94 ^{3}H-cDNA wurden nach Beendigung der Inkubation je 40 µl entnommen (vergleiche hierzu Legende zu Abb. 13).
Die drei Proben wurden mit je 260 µl SSC verdünnt und mit 2,5 Volumen Äthanol in 300 mM NaCl bei -20 °C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren und Trocknen wurden die Nucleinsäuren in je 100 µl SSC aufgenommen und in 9 Aliquots zu 10 µl (3 000 cpm) aufgeteilt. Die Proben wurden in Eppendorfgefäßen 2,5 min. bei den angegebenen Temperaturen (±0,5 °C) erhitzt und dann schnell 0,2 ml eiskalter S1-Puffer mit 0,5 U S1-Nuclease zupipettiert. Nach 60 min. Inkubation bei 45 °C wurde die säurefällbare Radioaktivität bestimmt (2.5.2.). Angegeben ist die Nuclease-S1 resistente Aktivität des Hybrids in Abhängigkeit von der Temperatur.

Cl-E-8 o-o-o Cl-F-2 Δ-Δ-Δ Cl-C-2 x-x-x

Insofern kann man für die Zellfusions-Linien Cl-E-8 und Cl-F-2 gemeinsam die Aussage machen: Beide Zellklone enthalten RNA, die mit 6/94 spezifischer cDNA korrekt basengepaarte, Einzelstrang-Nuclease stabile Hybride bildet. Bei ihrer Untersuchung zeigen diese Hybride die gleichen Eigenschaften wie das Modellhybrid aus 6/94 RNA und 6/94 cDNA. Das beweist, daß die Sequenzen der virusspezifischen Nucleinsäuren in den Zellen identisch sind mit der viralen RNA.
Das Ergebnis dieser Hybridisierungsexperimente steht damit auch im Einklang mit Untersuchungen, die in HAD- und IF-posi-

tiven Zellklonen auch elektronenmikroskopisch virale Nucleocapside nachweisen konnten (Iwasaki et al.1973, Koprowski et al.1975).

Die Analyse des Hybrids aus Cl-C-2 RNA und 6/94 cDNA nach Nuclease Verdau im Dichtegradienten ergibt ebenfalls eine klare Aussage: Von den eingesetzten 25.000 cpm ist nach Nuclease S1 Verdau nur ein einheitlicher Background von 30-70 cpm über den ganzen Gradienten verteilt übrig geblieben. Auch das Schmelzprofil zeigt nur eine gleichbleibende niedrige Aktivität.

Das bedeutet, daß mit Hilfe der 6/94 ^{3}H-cDNA in Cl-C-2 Zellen keine 6/94 spezifischen RNA-Sequenzen nachweisbar sind.

Mehrere Gründe können hierfür verantwortlich sein:

1) Obwohl die Stammzelle des Klons Cl-C-2 zu einer Population von Fusionszellen gehört, die alle von einer virus-positiven Gewebeprobe aus dem Gehirn einer M.S.-Patientin abstammen, ist sie jedoch grundlegend verschieden von ihren Schwesterfusionszellen. Sie kam vielleicht nie mit dem 6/94 Virus in Kontakt. Es gibt also in ihr überhaupt keine virusspezifische RNA. Ein zellulärer Schutzmechanismus gegen 6/94 Infektionen scheidet aus, da die Cl-C-2 Zellen voll reinfizierbar sind (Koprowski et al.1975).

2) Die Stammzelle des Cl-C-2 Klons enthielt vielleicht ursprünglich auch virusspezifische RNA. Durch die Isolierungs- und Fusionierungs-Prozedur hat sie jedoch diese fremde Nucleinsäure verloren. Aus diesem Grund kann auch kein Nachweis gelingen.

3) Die Cl-C-2 Fusionszellen enthalten immer noch virusspezifische RNA. Diese Sequenzen können aber von der in-vitro synthetisierten 6/94 cDNA nicht erkannt werden, weil sie nicht auf der cDNA repräsentiert sind oder weil sie die gleiche Nucleinsäurestrang-Polarität haben. Diese Frage wird im nächsten Abschnitt noch ausführlich behandelt.

4) In den Cl-C-2 Zellen wird die virale Information nicht in Form von RNA gespeichert, sondern in einer anderen Nucleinsäure. Aus diesem Grund kann die Suche nach virusspezifischer RNA mit Hilfe der cDNA nicht zum Erfolg führen.

Für einige Viren der Paramyxogruppe konnte nach chronischer Infektion von Zellkulturen das Auftreten virusspezifischer DNA in den Zellen gezeigt werden (Zhdanov et al.1976). Die Frage nach einer Analogie dieser Befunde zu dem hier untersuchten System wird später noch bearbeitet.
Wenn man die Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente mit 6/94 ^{3}H-cDNA kurz zusammenfaßt, ergibt sich folgendes Bild: In den Zell-Linien Cl-E-8 und Cl-F-2, in denen mit serologischen, immunologischen und elektronenoptischen Verfahren virusspezifische Proteine bzw. Nucleocapside nachzuweisen waren, befindet sich eindeutig virale Nucleinsäure. Die Hybridisierungsexperimente sind durch aussagekräftige Kontrollexperimente abgesichert.
In den Zellen des Klons Cl-C-2 ist mit Hilfe der 6/94 cDNA keine virusspezifische RNA nachweisbar.
Da dies auch durch eine Begrenzung der Nachweisfähigkeit der 6/94 RNA bedingt sein kann, soll dieser Aspekt in den folgenden Abschnitten untersucht werden.

3.2.3. Bestimmung der Nachweisgrenze des Hybridisierungssystems mit 6/94 cDNA

Die Ergebnisse der Versuche in den vorangegangenen Abschnitten zeigen, daß Cl-E-8 und Cl-F-2 Zellen virusspezifische RNA enthalten; dagegen ist diese in Cl-C-2 Zellen nicht nachzuweisen. Eine Erklärung hierfür besteht darin, daß im Fall der Cl-C-2 Zellen die virusspezifische RNA in so geringen Mengen vorliegt, daß sie durch Hybridisierung mit der 6/94 ^{3}H-cDNA nicht mehr nachzuweisen ist.
Aufgrund dessen wurde eine Abschätzung der pro Zelle noch nachweisbaren viralen RNA-Menge vorgenommen. Als erster Punkt wurde der Zusammenhang zwischen der Länge der synthetisierten cDNA und der Nachweisgrenze untersucht.
Die Kettenlänge der 6/94 ^{3}H-cDNA ist schon in 3.1. kurz erwähnt worden. Zu ihrer Bestimmung wurden alkalische Sucrosegradienten verwendet; es ergaben sich Verteilungen mit einem

s-Wert	Molekular-gewicht	Nucleotid-anzahl	Aktivität pro Fraktion (cpm)	Anteil der cDNA Stücke
2s	8.800	29	15.000	20%
3s	24.000	78	40.000	20%
4s	50.000	162	70.000	17%
5s	87.000	282	102.000	14%
6s	138.000	447	125.000	11%
7s	202.000	665	127.000	8%
8s	283.000	917	120.000	5%
9s	379.000	1228	93.000	3%
10s	494.000	1599	59.000	1%
11s	626.000	2028	30.000	1%
12s	779.000	2522	15.000	1%

Tab. 5: Zusammenfassende Darstellung einiger charakteristischer Größen von ausgewählten 6/94 cDNA Spezies und ihres Anteils an der Gesamtzahl der Moleküle.

Zur Vereinfachung wurden nur ganzzahlige s-Werte zwischen 2 und 12s berücksichtigt. Aus diesen wurde mit Hilfe der Formel von Studier (Studier 1965) das Molekulargewicht errechnet und durch Einsetzen eines mittleren Desoxy-Nucleosid-monophosphat-Gewichts von 308,75 g/Mol die Nucleotid-Zahl bestimmt. Die Angaben über Aktivität pro Fraktion stammen aus einem alkalischen Sucrose-gradienten mit typischer Verteilung der 6/94 ^{3}H-cDNA (Neubert 1976). Aus diesen Aktivitäten wurde unter Einbeziehung der c-DNA Länge der prozentuale Anteil von c-DNA Stücken pro Fraktion an der Gesamtpopulation errechnet.

Kurvenmaximum bei 7s (Neubert 1976). Wenn man aus diesem Sedimentationswert nach der Formel von Studier (Studier 1965) das Molekulargewicht errechnet, so erhält man rund 2×10^5 Dalton, das entspricht einer einzelsträngigen cDNA mit etwa 665 Nucleotiden.

Nun sagt dieses Gradientenprofil nur etwas über die Verteilung der Radioaktivität im Verhältnis zum s-Wert aus, nichts dagegen über die Anzahl der in jeder Fraktion enthaltenen cDNA Stücke. Um eine Abschätzung der Häufigkeit von Molekülen einer bestimmten Größe zu erhalten, muß man die gemessene Aktivität von jeder Fraktion zur typischen Aktivität der in ihr enthaltenen cDNA Stücke in Beziehung setzen. In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse dieser Berechnung zusammengefaßt.

Der fast symmetrischen Verteilung der Aktivität im alkalischen Sedimentationsgradienten steht eine völlig andere Häufigkeitsverteilung der cDNA Moleküle gegenüber. Die Spitzenfraktion bei 7s enthält nur rund 10% der gesamten cDNA Stücke. Die cDNA Moleküle mit s-Werten von 8-12s, die die Hälfte der gesamten Aktivität im Gradienten ausmachen, repräsentieren wiederum nur knapp 10% der cDNA Moleküle. Dagegen sind in den Fraktionen mit s-Werten kleiner 7s über 80% aller Moleküle enthalten.

Diese Überlegungen sind für eine Abschätzung der Nachweisgrenze, d.h. für die Abschätzung der Anzahl von Virusgenomen pro Zelle, die mit Hilfe der 6/94 cDNA noch nachgewiesen werden können, erforderlich.

Dazu mußte auch der RNA-Gehalt der Fusions-Zellen festgestellt werden. Dieser ist von der jeweiligen Stoffwechselsituation abhängig und wurde deshalb empirisch bestimmt: Die aus mehreren Fusionszell-RNA Präparationen isolierte RNA Menge wurde gemittelt und zur Zellzahl in Beziehung gesetzt. Die typische Zelldichte betrug 3×10^5 Zellen pro cm^2 Kulturfläche, aus 4000 cm^2 wurden durchschnittlich 3,2 mg gesamt-RNA extrahiert, das entspricht rund 2,6 pg RNA pro Zelle.

Wenn in einer Hybridisierung 300 µg zelluläre gesamt-RNA eingesetzt werden, dann entspricht das der RNA aus rund $1{,}13 \times 10^8$ Zellen. Wenn pro Zelle eine 6/94 50s RNA vorhanden ist, so befinden sich im Hybridisierungsansatz $1{,}13 \times 10^8$ 6/94 RNA Moleküle und (bei $1{,}1 \times 10^{-8}$ ng pro 6/94 Genom) dementsprechend 1,24 ng virale RNA.

Bei quantitativer Hybridisierung würde mit diesen 6/94 RNA Molekülen die gleiche Anzahl von cDNA Stücken hybridisieren. (Dabei wird als ungünstigste Annahme vorausgesetzt, daß alle cDNA Stücke die gleiche Sequenz repräsentieren und deshalb nur ein cDNA Stück mit einer viralen RNA reagieren kann. Diese Frage wird im nächsten Abschnitt noch diskutiert.) Geht man von cDNA Molekülen mit einem s-Wert von 7s aus, so würden im oben genannten Fall $1{,}13 \times 10^8$ 7s-cDNA Stücke mit der viralen RNA reagieren, das sind bei $3{,}4 \times 10^{-10}$ ng/7s Stück 0,04 ng cDNA. Dieser cDNA Menge entsprechen bei einer spezifischen

Aktivität der 6/94 ^{3}H-cDNA von $6{,}32 \times 10^{6}$ cpm/µg 243 cpm. Da aber aus Tabelle 5 ersichtlich ist, daß die 7s cDNA nicht die repräsentative Länge der synthetisierten 6/94 cDNA darstellt, wurde aus den Daten der Tabelle eine "gewichtete" cDNA bestimmt. Dazu wurden die Produkte aus Molekulargewicht und Häufigkeit der 11 cDNA-Species addiert und durch die Summe der Häufigkeiten dividiert. Die so ermittelte "gewichtete" cDNA hat einen s-Wert von 5,18s, das entspricht einem MW von 95.308 Dalton und einer Länge von 308 Nucleotiden. Setzt man diese cDNA in die oben gemachte Berechnung ein, so würde man bei quantitativer Hybridisierung 114 cpm erwarten, wenn jede Zelle im Durchschnitt ein Virusgenom enthält. Dieser theoretischen Berechnung zur Nachweisgrenze von viraler RNA wurde eine experimentelle Modellhybridisierung zur Seite gestellt. 6/94 RNA wurde in unterschiedlichen Mengen mit 6/94 ^{3}H-cDNA in Gegenwart von einem Überschuß an unspezifischer RNA hybridisiert. In Abbildung 18 sind diese Versuche zusammenfassend dargestellt.

Bei Verringerung der viralen RNA-Konzentration im Bereich von 1000 bis 250 ng erhält man eine gleichbleibende Hybridisierungsrate. Unter 250 ng RNA nimmt die Hybridaktivität als Funktion der RNA-Konzentration ab. 1 ng eingesetzte Virus-RNA ergibt noch eine Hybridisierung, deren Aktivität um den Faktor 2 über dem Background (Hybridisierung ohne 6/94 RNA) liegt. Aus diesem Versuch ohne virale RNA geht ebenfalls hervor, daß die im Überschuß zugesetzte unspezifische RNA keinen sichtbaren Einfluß auf das Ergebnis der Hybridisierungen hat. Die verbleibende Aktivität von 236 cpm entspricht dem Background des Nuclease Systems.

Das Ergebnis dieses Versuchs stimmt gut mit der rechnerischen Voraussage überein: Die eingesetzten 1,58 ng 6/94 cDNA (10.000 cpm) sollten quantitativ mit 110 ng viraler 6/94 RNA hybridisieren; das Versuchsergebnis zeigt den Beginn der quantitativen Hybridisierung zwischen 100 und 250 ng eingesetzter viraler RNA. An 1 ng 6/94 RNA sollten rund 0,01 ng 6/94 cDNA hybridisieren können (die "gewichtete" cDNA vorausgesetzt); dies würde eine Hybridisierung von rund 100 cpm über Back-

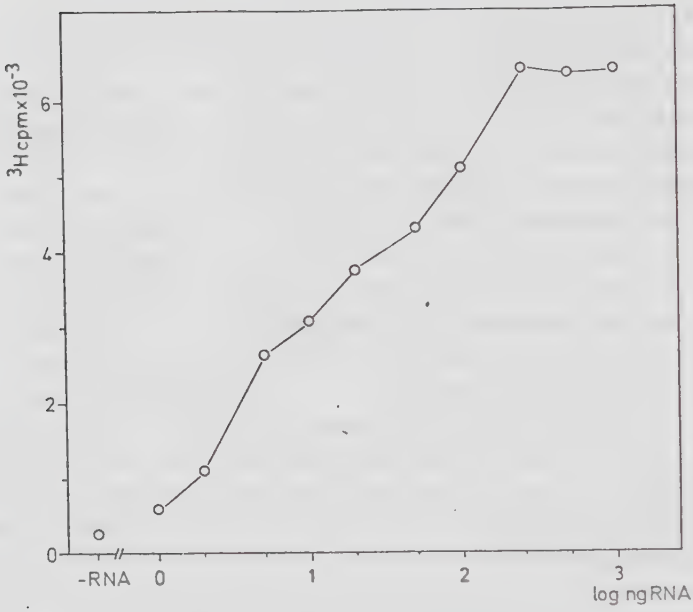


Abb. 18 : Hybridisierung von 6/94 ^{3}H-cDNA mit verschiedenen Mengen viraler 6/94 RNA in Gegenwart von einem hohen Überschuß an unspezifischer RNA.

In elf 50 µl Hybridisierungsansätzen mit 400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM EDTA und 60% Formamid wurden 10 000 cpm 6/94 ^{3}H-cDNA und 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 250, 500, 1000 ng 6/94 Virus RNA in Gegenwart von je 150 µg gesamt-RNA aus Hela Zellen bei 37 °C für 96 Std. inkubiert. (Extraktion der zellulären gesamt-RNA: siehe Legende zu Abb. 13). Nach Beendigung der Hybridisierung wurden je 700 µl S1-Puffer mit 5 U S1-Nuclease zugegeben und die Ansätze 50 min. bei 45 °C verdaut. Anschließend wurde die säurefällbare Radioaktivität (2.5.2.) in jedem Test bestimmt. Aufgetragen ist der Log der eingesetzten ng 6/94 RNA und die zugehörige säurefällbare Radioaktivität.

ground ergeben. Auch diese Berechnung stimmt weitgehend mit dem Ergebnis des Versuchs überein.

Aus der Modell-Hybridisierung und den angestellten Berechnungen kann man für den Nachweis von 6/94 RNA in Zellen mit Hilfe der ^{3}H-cDNA Folgendes ableiten:

Im vorliegenden Hybridisierungssystem ist es möglich, 1-2 ng 6/94 RNA in einem Überschuß von unspezifischer zellulärer RNA

mit Hilfe der ^{3}H-cDNA nachzuweisen. Dies bedeutet, daß man dadurch in der Lage ist, noch ein Virusgenom pro Zelle zu erkennen,(den ermittelten RNA-Gehalt der Fusionszellen vorausgesetzt).
Bei diesen Überlegungen wurde von der ungünstigsten Voraussetzung ausgegangen, daß nur eine cDNA Sequenz in unterschiedlicher Länge synthetisiert wird und deshalb jedes virale RNA Molekül nur mit einem cDNA Stück hybridisieren kann. Wenn anderenfalls die cDNA Synthese an mehreren Stellen der 6/94 startet, ergeben sich verschiedene unterschiedliche cDNA-Sequenzen, die alle mit einem viralen RNA Molekül hybridisieren können. Da damit die Nachweisgrenze des Hybridisierungssystems verbessert würde, wurde dieser Gesichtspunkt durch eine Reihe weiterer Experimente untersucht, in die gleichzeitig die Frage nach der Polarität der 6/94 cDNA mit einbezogen wurde.

3.2.4. Experimentelle Aussagen zur Polarität und transcribierten viralen Sequenz der 6/94 cDNA

Eine weitere Alternative für den fehlenden Nachweis von 6/94 spezifischer RNA in den C1-C-2 Zellen mittels cDNA-Hybridisierung wurde weiter oben schon angesprochen. Wenn die entscheidende virusspezifische Sequenz auf der cDNA nicht vorhanden ist bzw. die Polarität von cDNA und nachzuweisender RNA gleich ist, sind keine positiven Hybridisierungsergebnisse zu erwarten. Da bereits im vorigen Abschnitt gezeigt wurde, daß die 6/94 cDNA aus Stücken besteht, deren Länge höchstens 1/10 des viralen Genoms beträgt, stellt sich somit die Frage, ob die cDNA Synthese an mehreren Stellen oder nur an einem Punkt des viralen Genoms beginnt. Gleichzeitig sollte geklärt werden, ob die Reverse Transcription nur an der viralen -Strang RNA abläuft, oder auch an der in geringen Mengen im Virus enthaltenen +Strang RNA.
Für den Start der Reversen Transcription enthält die RNA der Retroviren einen natürlichen Primer (Verma et al.1978), bzw. bei in-vitro Synthesen kann an die poly-A Sequenz der viralen

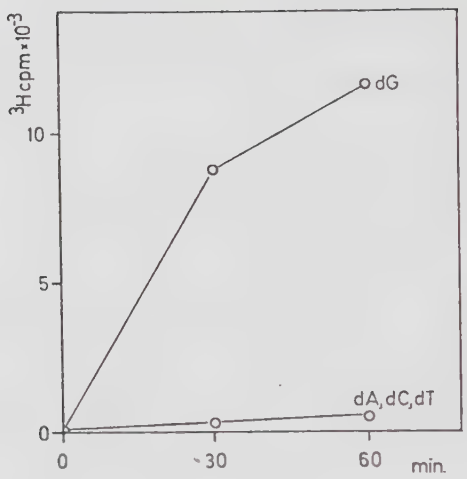


Abb. 19: Reverse Transcription an 6/94 RNA unter Verwendung verschiedener Oligonucleotide als Primer.

In Parallelansätze (100 µl) mit 10 mM MgAc, 10 mM DTE, 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 1 mM ATP (mit NaOH auf pH 6,5 eingestellt), 60 mM KCl, 20 µg BSA, je 330 mM der kalten dNTPs, 5 µg Act. D, 10 U Reverser Transcriptase aus AMV, 5 µCi ^{3}H-dGTP (8 Ci/mMol) und 1 µg 6/94 RNA wurde je 1µg der Oligonucleotide $d(pA)_{10}$, $d(pC)_{10}$, $d(pG)_{10-18}$ und $d(pT)_{12}$ zugegeben und die Ansätze bei 42 °C inkubiert. Nach 0', 30' und 60' erfolgte die Entnahme je eines 30 µl Aliquots. Dieses wurde sofort mit 50 µl 1%iger BSA-Lösung und 500 µl eiskalter 10%iger TCA (mit 1% Diphosphat) versetzt und 15 min. bei 4 °C gefällt. Anschließend wurden die säurefällbaren Nucleinsäuren auf Nitrocellulose-Filtern gesammelt, die Filter 30 min. bei 80 °C getrocknet und die Radioaktivität in Toluolszintillator im Nuclear-Chikago-Szintillationszähler bestimmt. Angegeben sind die eingebauten ^{3}H-GMP-cpm der einzelnen Versuche zu den betreffenden Zeiten.

RNA das oligo-Nucleotid oligo-dT als Primer anhybridisiert werden (Myers et al.1977). Die RNA der Paramyxoviren enthält dagegen nach dem heutigen Wissensstand keine vergleichbaren Startstellen für die Reverse Transcriptase.
In der bereits erwähnten Arbeit über cDNA Synthese an 6/94 RNA (Neubert 1976) war die Primer-Funktion von oligo-dG für die Reverse Transcription an 6/94 RNA gefunden worden. Da für Paramyxovirus RNA keine besonders rC-reichen Sequenzen bisher beschrieben sind, wurde eine unspezifische Bindung an die 6/94

RNA angenommen. In der Abbildung 19 ist ein Experiment wiedergegeben, bei dem die Reverse Transcription an 6/94 RNA in Gegenwart verschiedener käuflicher oligo-Nucleotide erprobt wurde.
Eine hohe cDNA Synthese zeigt sich nur bei Zugabe von oligo-dG. Die restlichen drei oligo-Nucleotide haben als Primer für die Reverse Transcription an 6/94 RNA keinen Effekt. Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten: Als Mitglied der Paramyxogruppe gehört das 6/94 Virus zu den "Negativ Strang Viren". Diese Viren packen beim Reifungsprozeß in der Zelle manchmal auch virusspezifische cRNA mit in das Viruspartikel ein; deshalb enthält auch die aus gereinigten Paramyxoviren isolierte RNA immer einen cRNA-Anteil, der zwischen 5 und 30% liegen kann (Robinson 1970, Portner et al.1971). Man sollte nun erwarten, daß der Zusatz von oligo-dC ebenso die Reverse Transcription an 6/94 RNA ermöglicht wie oligo-dG. Wenn der eine RNA-Strang eine Sequenz enthält, die eine Anlagerung von oligo-dG ermöglicht, müßte im complementären Strang die entsprechende Region für oligo-dC vorhanden sein. Da oligo-dC als Primer aber völlig wirkungslos ist, scheint dies nicht der Fall zu sein.
Auch andere Versuche, bei denen die virale RNA zusammen mit einzelnen oder mit gemischten Primern präinkubiert wurde, um mögliche Sekundärstrukturen der 6/94 RNA zu beseitigen, zeigten das gleiche Ergebnis. Nur in Ansätzen, bei denen oligo-dG zugesetzt war, erfolgte Reverse Transcription an der 6/94 RNA.

In einem weiteren Versuch zur Klärung der Funktion von oligo-dG wurde virale 6/94 RNA im Sucrosegradienten sedimentiert und in hoch-, mittel- und nieder-molekulare RNA aufgetrennt. Diese drei RNA-Fraktionen wurden nun einzeln mit jedem der vier oligo-Nucleotide auf ihre Primer-Funktion bei der cDNA Synthese untersucht. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 20 zusammengefaßt.
Es stellte sich dabei heraus, daß wiederum nur oligo-dG die Reverse Transcription an 6/94 RNA ermöglicht. Allerdings ist die cDNA Synthese mit oligo-dG als Primer bei den drei RNA-Fraktionen unterschiedlich: Bei den kurzen 6/94 RNA Stücken

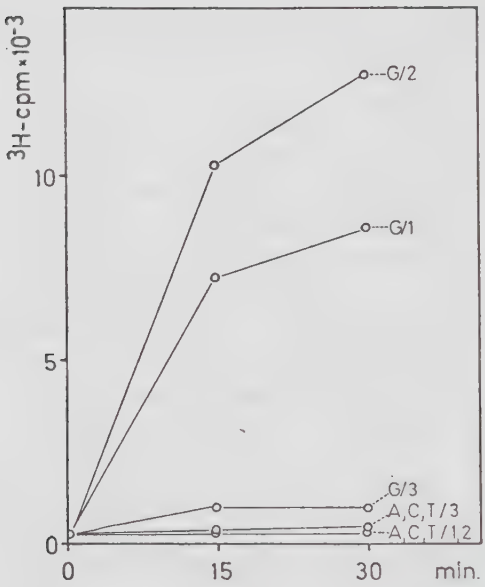


Abb. 20: Reverse Transcription an 6/94 RNA mit unterschiedlichem Molekulargewicht unter Zusatz je eines der vier Oligonucleotide als Primer.

80 µg 6/94 gesamt-RNA wurden in 100 µl STE mit 0,1% SDS gelöst und auf einem linearen Sucrose-Gradienten von 5-20% Sucrose in STE mit 0,1% SDS für 60 min. bei 45 000 rpm und 17 °C im SW 56 Rotor der Beckman Ultrazentrifuge sedimentiert. Auf einem Parallel gradienten waren 100 µg ribosomale RNA aus C1-C-2 Zellen als Marker aufgetragen. Nach dem Lauf wurden die Gradienten von unten angestochen und fraktioniert. Die optische Dichte des Markergradienten wurde dabei mit Hilfe eines LKB-Uvicord Durchflußphotometers bei 256 nm Wellenlänge bestimmt. Unter Berücksichtigung der Verteilung der ribosomalen RNA im Gradienten wurden die Fraktionen mit 6/94 RNA in drei s-Wert Bereiche gepoolt: größer 35s, 35-10s, kleiner 10s. In die 100 µl Ansätze für die Reverse Transcription (weitere Angaben zu dem Ansatz siehe vorherige Abbildung) wurden 0,5 µg High-MW-RNA (1), 0,6 µg Middle-MW-RNA (2) oder 0,9 µg Low-MW-RNA (3) in Gegenwart von 1µg der angegebenen Oligo-Nucleotide eingesetzt. Nach 0, 15 und 30 min. der Inkubation bei 42 °C wurden je 30 µl Aliquots entnommen und die säurefällbare Radioaktivität bestimmt. Diese ist in Abhängigkeit von der Zeit für die verschiedenen RNA Spezies/Oligo-Nucleotid Paare angegeben.

ergibt sich kein wesentlicher Einbau; die hochmolekulare RNA über 35s ergibt einen guten Einbau und bei der RNA mit s-Werten zwischen 10 und 35s liegt die Einbaurate fast um den Faktor 2 höher.
Dieses Ergebnis läßt folgende Interpretation zu:
Da die Reverse Transcription an 6/94 RNA nur mit oligo-dG zu starten ist, nicht hingegen mit oligo-dC, liegt die Vermutung nahe, daß sich die Anheftungsstelle für das Primer-Molekül oligo-dG in der Nähe des 3'-OH Endes befindet. Dadurch würde verständlich, wieso die Reaktion unter Zusatz von oligo-dC keinen erkennbaren Einbau liefert. Dieser Primer lagert sich auf dem complementären Strang im Bereich des 5'-OH Endes an und die Reverse Transcriptase wird schon nach wenigen Nucleotiden durch das Ende des Templates gestoppt.
Andererseits bedeutet dieser Befund auch, daß die Reverse Transcription an 6/94 RNA in Gegenwart von oligo-dG nur an einer Stelle auf dem Molekül beginnt; denn bei mehreren Startpunkten, die dann zwangsläufig auch weiter entfernt vom 3'-OH Ende der RNA liegen müßten, wäre sicher mit einer cDNA Synthese an der cRNA unter Zusatz von oligo-dC zu rechnen.
Unter der Interaktion zwischen 6/94 RNA und dem Primer oligo-dG könnte man sich auch einen völlig unspezifischen Vorgang vorstellen, den dieses oligo-Nucleotid mit jeder RNA eingeht. Daß dies nicht der Fall ist, zeigt der in Abbildung 20 wiedergegebene Versuch: An den kleinen RNA Stücken, die sicher Degradationsprodukte der viralen RNA sind, ist auch unter oligo-dG Zusatz nur geringe Reverse Transcription möglich. Das heißt andererseits, daß es auf der 6/94 RNA doch eine spezifische Region geben muß, an die der Primer sich anlagert. Nach weitgehender Zerstückelung der viralen RNA gibt es dann auch in der Fraktion mit kurzer RNA einige Stücke, an denen nach Anlagerung von oligo-dG geringfügig cDNA synthetisiert werden kann (Kurve G3). Die hohe cDNA Synthese an RNA mit mittlerem s-Wert kann man dadurch erklären, daß sich in dieser Fraktion die auch bei defektiven Sendai Viren beschriebenen RNAs mit s-Werten von 19-24s befinden (Kingsbury et al.1971); diese kürzeren RNA Moleküle enthalten also auch die Anlagerungsstelle

für oligo-dG und steigern durch ihre erhöhte Anzahl die Einbaurate.
Wenn man die Ergebnisse aus 3.2.3. und 3.2.4. kurz zusammenfaßt, ergibt sich für den Nachweis von virusspezifischer RNA mit Hilfe der cDNA Folgendes:
Die cDNA Synthese an 6/94 RNA verläuft nach Zugabe des Primers oligo-dG nur an einem Strang, wahrscheinlich in der Nähe des 3'-OH Endes; bei diesem Strang dürfte es sich um den -Strang handeln, da auch RNA aus inkompletten Viruspartikeln revers zu transcribieren ist. Die synthetisierte cDNA erreicht ein Molekulargewicht bis zu 1×10^6 Dalton, wobei sich allerdings die Anzahl der synthetisierten Moleküle in Abhängigkeit von der Produktlänge verringert. Bei einem repräsentativen s-Wert der 6/94 cDNA von 5,18s ist noch eine um den Faktor 2 über dem Background liegende Hybridisierung möglich, wenn je Zelle im Mittel nur ein 6/94 Genom vorhanden ist. Angewendet auf die drei Fusionszell-Linien bedeutet dies, daß in den virusproduzierenden Zellen Cl-E-8 und Cl-F-2 eine Vielzahl von Virusgenomen vorhanden ist; die Zell-Linie Cl-C-2, die keine Hybridisierung zeigt, enthält entweder keine virale 6/94 RNA oder weniger als eine Kopie pro Zelle. Es ist aber auch denkbar, daß für die virale Persistenz nicht das gesamte Virusgenom erforderlich ist. In diesem Fall reicht die Nachweisfähigkeit der 6/94 cDNA nicht aus, da sie nur einen Teil des viralen Genoms repräsentiert. Dieser Annahme steht jedoch entgegen, daß latente Viren z.B. durch Zellfusionierung in einen infektiösen Zustand zurückversetzt werden können. Da dafür die Information für alle viralen Proteine erforderlich ist, müssen auch im latenten Virus die entsprechenden Nucleinsäure-Sequenzen vorhanden sein.
Aus dem oben Gesagten geht weiter hervor, daß eine virale Persistenz durch +Strang RNA mit der z.Zt. zur Verfügung stehenden 6/94 cDNA nicht nachzuweisen ist. Obwohl eine Speicherung der viralen Information auf dem cRNA- oder mRNA-Niveau nicht sehr wahrscheinlich erscheint, wurden trotzdem Versuche durchgeführt mit dem Ziel, in den Fusionszellen auch die virusspezifische mRNA erkennbar zu machen. Diese Ergebnisse sind im nächsten Abschnitt beschrieben.

3.3. Versuche zum Nachweis von virusspezifischer RNA in den Fusionszell-Linien durch selektive Markierung der 6/94 RNA

Da durch die Hybridisierung mit 6/94 cDNA der Nachweis von virusspezifischer RNA mit +Polarität nicht erreicht werden konnte, wurde nach anderen Methoden gesucht, um eine Beteiligung von viraler cRNA und mRNA an der Persistenz von Viren in den Fusionszellen zu überprüfen.
Ein mögliches Verfahren hierzu, nämlich die Hybridisierung mit -Strang cDNA wurde nicht eingesetzt. Es wäre dazu erforderlich gewesen, die Reverse Transcriptase ohne Act.D Hemmung einen DNA-Doppelstrang synthetisieren zu lassen; von den Versuchen mit RNA Tumorviren ist jedoch bekannt, daß der synthetisierte ccDNA Schwesterstrang nur eine Länge von 10-14% des zuerst synthetisierten cDNA Stranges erreicht.(Verma et al. 1978). Dadurch würde im Fall einer 6/94 ccDNA die kritische Länge bezüglich der Spezifität unterschritten.
Deshalb wurde eine andere Nachweistechnik eingesetzt: Durch selektive Markierung wurde die virale RNA in den Fusionszellen erkennbar gemacht. Im Folgenden sind diese Versuche zum Nachweis von viraler RNA und virusspezifischer mRNA wiedergegeben.

3.3.1. Nachweis von hochmolekularer 6/94 RNA durch direkte Markierung von virusspezifischer RNA in Fusionszellen

Durch Zusatz von Act.D zum Nährmedium von Zellkulturen wird die zelluläre DNA-abhängige RNA Polymerase gehemmt. Dadurch hört die gesamte Synthese von zellulärer RNA auf (Bratt et al. 1967). Gleichzeitig wird das virusspezifische Enzym RNA-abhängige RNA Polymerase in Zellen, die mit Paramyxoviren infiziert sind, durch Act.D Zusatz nicht gehemmt. Die Synthese von viraler RNA läuft also ungehindert weiter. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, die Synthese von viraler RNA durch den Einsatz von radioaktiv markierten RNA-Vorstufen selektiv sichtbar zu machen, denn die Aktivität wird nur vom viralen Enzym in Nucleinsäuren eingebaut.

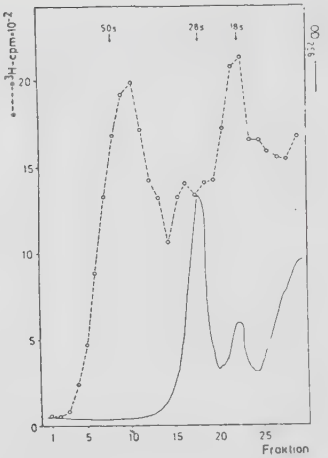


Abb. 21: Sedimentationsanalyse der in Cl-E-8 Zellen in Gegenwart von Act. D synthetisierten RNA.

Angegeben ist die optische Dichte der gesamt-RNA im Gradienten bei 256 nm (——) sowie die säurefällbare Radioaktivität der Fraktionen des Gradienten (o--o).

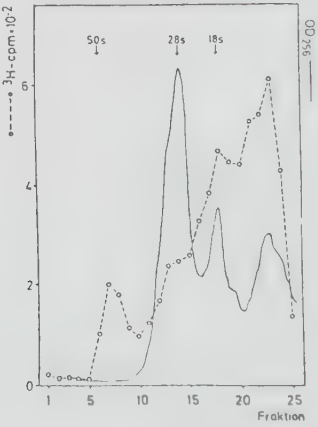


Abb. 22: Sedimentationsanalyse der in Cl-F-2 Zellen in Gegenwart von Act. D synthetisierten RNA.

Angegeben ist die optische Dichte bei 256 nm der gesamt-RNA im Gradienten (——) sowie die säurefällbare Radioaktivität der Fraktionen des Gradienten (o--o).

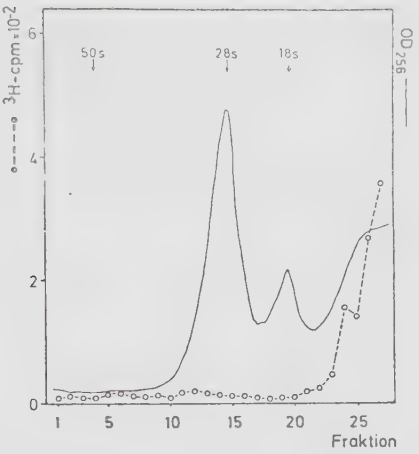


Abb. 23 : Sedimentationsanalyse der in Cl-C-2 Zellen in Gegenwart von Act. D synthetisierten RNA.

Zellen von jeder der drei Fusionszell-Linien Cl-C-2, Cl-E-8 und Cl-F-2 wurden in 150 cm^2 Kulturflaschen in MEM F-15 Medium mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum und Antibiotika vermehrt. Nach Erreichen eines geschlossenen Zellrasens wurde das Medium entfernt und neues Kulturmedium mit 2% fetalem Kälberserum und 10 µg/ml Act. D zugegeben. Die zelluläre RNA-Polymerase wurde durch Inkubation der Kulturen für 90 min. bei 33 °C gestoppt. Dann wurde das Medium nochmals gewechselt und die Zellen nach Zugabe von 25 µCi/ml ^{3}H-Uridin (47 Ci/mMol) und 10 µg/ml Act. D für 4 Std. bei 33 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums mit Pbs^- gewaschen und unter Pbs^--Puffer mit einem Teflonschaber abgekratzt. Nach Abkühlen der Zellsuspension auf 4 °C wurden die Zellen 15 min. bei 1 000 rpm, 4 °C in der Christzentrifuge pelletiert und der Überstand verworfen. Durch Inkubation mit 700 µl hypotonischen Lysopuffer pro 150 cm^2 Kulturflasche für 5 min. bei 4 °C und nachfolgendes Homogenisieren mit dem Glasdouncer "S" wurden die Zellen aufgeschlossen. Nach Zugabe von 1/10 Volumen Puffer "Z" wurde das Zellhomogenisat zum Abtrennen der schnell sedimentierenden Bestandteile (Kerne, Membranen, Mitochondrien) für 20 min. mit 10 000 rpm, 4 °C im SS 34 Rotor der Sorvallzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und nach Zugabe von SDS auf 1 % Endkonzentration mit einem Volumen puffergesättigtem, neutralisiertem Phenol intensiv gemischt. Die Phasen wurden dann durch niedertourige Zentrifugation getrennt, die wässrige Phase noch zweimal mit Phenol von Proteinen gereinigt. Die letzte wässrige Phase wurde dann auf 400 mM NaCl gebracht und mit 2,5 Volumina Äthanol die Nucleinsäure in der Kälte bei -20 °C gefällt. Durch weiteres Umfällen mit Äthanol wurden Phenolverunreinigungen aus der Nucleinsäurepräparation entfernt. 50 µg der gereinigten RNA wurden dann in STE mit 0,1% SDS gelöst, auf einen kontinuierlichen Gradienten aus 5-20% Sucrose in STE

mit 0,1% SDS überschichtet und für 80 min. bei 45 000 rpm, 17°C im SW 56 Rotor einer Beckman Zentrifuge sedimentiert. Anschließend wurde der Gradient von unten angestochen und nach Durchlauf eines UV-Spektralphotometers fraktioniert. Die säurefällbare Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde wie in 2.5.2. beschrieben, bestimmt.
Angegeben ist die optische Dichte bei 256 nm der gesamt-RNA im Gradienten (——) sowie die säurefällbare Radioaktivität in den Gradienten-Fraktionen (o--o).

Diese Methode wurde nun dazu benutzt, die Synthese von 6/94 spezifischer RNA in den drei Fusionszell-Linien nachzuweisen. Damit sollte die Frage geklärt werden, ob die Cl-C-2 Zellen virusspezifische RNA enthalten.
In Parallelversuchen wurde nun in dichtgewachsenen Zellkulturen die zelluläre RNA Synthese durch Act.D gehemmt und mit radioaktiven Vorstufen die synthetisierte virale RNA markiert. Diese wurde zusammen mit der zellulären RNA extrahiert und beide zusammen im Sedimentationsgradienten analysiert. Die entsprechenden Gradienten sind in den Abbildungen 21 bis 23 wiedergegeben.
In Gegenwart von Act.D synthetisieren die Cl-E-8 und Cl-F-2 Fusionszellen hochmolekulare RNA. Diese Nucleinsäure mit einem s-Wert um 50s ist sicher virusspezifisch. Auch im Bereich zwischen 18 und 24s, in dem die RNA aus inkompletten Viren bandiert, zeigt sich Aktivität. Ihr Anteil ist bei den beiden Zell-Linien unterschiedlich und schwankt auch zwischen den einzelnen Präparationen.
Ein völlig anderes Bild ergibt sich für die RNA aus Cl-C-2 Zellen: Die zelluläre RNA zeigt die von den anderen Fusionszellen her bekannte Verteilung. Jedoch ist in Gegenwart von Act.D keine Synthese von RNA mit virusspezifischen Sedimentationswerten nachweisbar. Dies bedeutet, daß die Cl-C-2 Zellen keine 6/94 spezifische RNA synthetisieren.
Um sicher zu sein, daß mit diesem Test auch virale mRNA erfaßt wird, wurde in weiteren Versuchen die in den Zellen unter Act.D synthetisierte RNA in poly-A haltige und poly-A freie RNA aufgetrennt.

3.3.2. Überprüfung der Fusionszellen auf poly-A haltige, virusspezifische RNA

Wie bereits erwähnt gibt es in Zellen, die mit Paramyxoviren infiziert sind, virusspezifische RNA von unterschiedlicher Polarität. Außer der cRNA weisen auch alle viralen mRNAs +Polarität auf; letztere sind zusätzlich polyadenyliert und zeigen s-Werte von 18-22s, 35s und 50s (Pridgen et al.1972). Anhand ihrer poly-A Sequenz kann die mRNA von der anderen RNA abgetrennt und damit nachgewiesen werden.
Die RNA aus den drei Fusionszell-Linien wurde nun einer solchen Analyse auf poly-A haltige, virusspezifische RNA unterzogen. Dies geschah mit Hilfe von Affinitäts-Chromatographie an oligo-dT Zellulose (Gilham et al.1964, Faust et al.1973). Poly-A haltige RNA bindet unter geeigneten Bedingungen an die oligo-dT Zellulose, während die poly-A freie RNA durch die Säule hindurchläuft. Die poly-A RNA kann durch Pufferwechsel von der Säule eluiert werden. Für RNA aus Cl-F-2 Zellen ist dieses Experiment in der Abbildung 24 dargestellt.
Die RNA aus Cl-F-2 Zellen läßt sich mit Hilfe der oligo-dT Zellulose-Säule in zwei Klassen auftrennen. Nach Beladen der Säule erscheint zusammen mit dem Waschpuffer die nichtgebundene poly-A freie RNA. Daran anschließend wird durch den Niedrigsalzpuffer die poly-A RNA von der Säule eluiert. Der Anteil der poly-A RNA an der gesamt-RNA ist sehr gering. Das OD-Profil bezieht sich auf die gesamte aus den Zellen isolierte RNA, d.h. auf die unmarkierte zelluläre und auf die markierte virusspezifische RNA.
Wenn man die ^{3}H-markierte, virusspezifische RNA im Vergleich hierzu betrachtet, so ist auch diese durch die oligo-dT Säule nach ihrem poly-A Gehalt aufgetrennt. Jedoch ist der Anteil der virusspezifischen poly-A RNA viel größer als bei der zellulären gesamt-RNA, da in der Zelle alle virusspezifischen RNA-Moleküle mit +Polarität polyadenyliert sein können (Pridgen et al.1972).
Die Auftrennung von RNA aus Cl-E-8 Zellen zeigt ein ähnliches Bild.

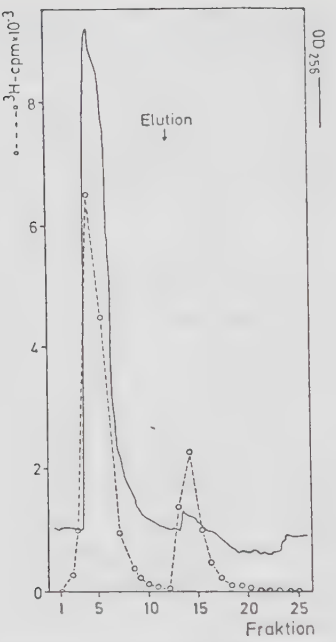


Abb. 24: Abtrennen von poly-A-haltiger RNA aus der gesamt-RNA von unter Act. D gezogenen Cl-F-2 Zellen.

Cl-F-2 Zellen wurden in Gegenwart von Act. D inkubiert und die neusynthetisierte RNA mit ^{3}H-Uridin markiert. Aus den Zellen wurde nach Abschluß der Inkubation die RNA extrahiert (siehe Legende der vorherigen Abbildung). 100 µg gereinigte Cl-F-2 RNA wurden in Hochsalzpuffer (500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1% SDS) aufgenommen und auf eine Säule aus 0,4 ml oligo-dT Cellulose aufgetragen.(Die Säule war zuvor mit 5 ml Hochsalzpuffer gewaschen worden). Dann wurde die Säule mit 5 ml Hochsalzpuffer bei einer Durchflußrate von 1 ml pro 4 min. gewaschen. Dabei wurde die optische Dichte des Waschpuffers nach Verlassen der Säule im UV-Durchflußphotometer gemessen. Nach Erreichen der OD-Basislinie, in der Regel nach 5 ml Puffer-Durchfluß, begann die Elution der poly-A-haltigen RNA mit Zugabe von 5 ml Niedrigsalzpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1% SDS). Auch dieser Puffer wurde nach Durchlaufen der Säule im UV-Bereich bei 256 nm gemessen. Waschpuffer und Eluat wurden in 0,5 ml Fraktionen geteilt und die säurefällbare Radioaktivität bestimmt (2.5.2.). Angegeben sind die optische Dichte des Säulendurchlaufs (———) und die gemessene Radioaktivität der einzelnen Fraktionen (o--o). Laufrichtung der Säule von links nach rechts.

Dagegen ist bei RNA aus Cl-C-2 Zellen nur die Auftrennung der zellulären RNA nach optischer Dichte möglich. Virusspezifische, ^{3}H-markierte RNA konnte aus diesen Zellen nicht isoliert werden, sodaß die Auftrennung dieser RNA nur einen gleichbleibenden Background in allen Fraktionen ergab.
Wenn man die Ergebnisse dieses Kapitels zusammenfaßt, so ergibt sich folgendes Bild: Die in den Fusionszell-Linien Cl-E-8 und Cl-F-2 in Gegenwart von Act.D synthetisierte 6/94 spezifische RNA zeigt eine normale s-Wert Verteilung im Sedimentationsgradienten. Die Zellen enthalten virusspezifische RNA mit s-Werten um 50s und zwischen 18 und 24s. Diese RNA läßt sich in poly-A haltige und poly-A freie RNA auftrennen. Damit ist das gesamte Spektrum der bisher in infizierten Zellen gefundenen virusspezifischen RNA-Species nachgewiesen.
Im Gegensatz dazu ist in Cl-C-2 Zellen keine virusspezifische, radioaktiv markierte RNA nachweisbar. Entsprechend negativ ist das Ergebnis der Abtrennung von virusspezifischer poly-A RNA aus diesen Zellen. Dies bedeutet, daß die Cl-C-2 Zellen überhaupt keine 6/94 spezifische RNA synthetisieren. Das Ergebnis steht im Einklang mit den Resultaten der Hybridisierungsexperimente mit 6/94 cDNA. Zusätzlich kann man jetzt noch die Aussage machen, daß die Cl-C-2 Zellen auch keine virale RNA mit +Polarität enthalten, die durch die 6/94 cDNA nicht nachgewiesen werden kann.
Damit ist der erste Teil der Arbeit, der sich mit dem Nachweis von virusspezifischer RNA in den Fusionszellen beschäftigte, abgeschlossen. In den zwei viruspositiven Fusionszell-Klonen konnten alle viralen RNA-Species nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ist in der Zell-Linie Cl-C-2 keine einzige 6/94-spezifische RNA auffindbar. Damit ergeben sich aus dem vorliegenden Virus-Zell-System keine Hinweise auf eine Beteiligung von viraler RNA bei der Persistenz von Viren.
Umso mehr erhöht sich infolgedessen das Interesse an einer Untersuchung der Fusionszellen auf virusspezifische DNA-Sequenzen. Diese Versuche werden im zweiten Teil der Arbeit beschrieben.

3.4. Nachweis von 6/94-spezifischen DNA-Sequenzen in den drei Fusionszell-Linien

Nach Abschluß der Experimente zum Nachweis von virusspezifischer RNA in den drei Fusionszell-Linien folgte nun als nächster Fragenkomplex die Suche nach 6/94 spezifischer DNA in diesen Zellen.
Die Arbeitsgruppen von Zhdanov und Sipmson hatten in der Zwischenzeit zeigen können, daß sich nach chronischer Infektion mit verschiedenen RNA-Viren, unter anderem auch Paramyxoviren, in Zellkulturen virusspezifische DNA Sequenzen nachweisen lassen (Zhdanov et al.1974, Simpson et al.1975).
Dieser durch experimentelle Infektion von Zellen erreichte Befund sollte nun an dem "natürlich" infizierten Virus-Zell-System aus 6/94 Viren und den drei Fusionszell-Klonen überprüft werden. Die Fragestellung lautete: Sind in den aus M.S.-Patienten isolierten Zell-Linien virusspezifische DNA Sequenzen als Hinweise auf latente Viren nachzuweisen?
Die Beantwortung dieser Frage erfolgte wieder durch Hybridisierungsexperimente; wie schon im ersten Teil der Arbeit sollten als Hybridisierungsprodukte RNA/DNA Hybride entstehen, deren eingehende Charakterisierungsmöglichkeiten bereits beschrieben wurden. Da in diesem Fall virusspezifische DNA nachgewiesen wurde, mußte als Hybridisierungsprobe eine markierte 6/94 RNA verwendet werden. Die einwandfreie Isolierung und Charakterisierung dieser 6/94 ^{3}H-RNA, sowie die sorgfältige Reinigung der erforderlichen Viren, sind für die Aussagekraft der nachfolgenden Experimente von entscheidender Bedeutung und sollen deshalb zunächst ausführlich beschrieben werden.

3.4.1. Reinigung von 6/94 Viren und Überprüfung des Isolates

An die 6/94 Viren als Ausgangssubstanz für die virale RNA wurden besonders hohe Reinheits-Anforderungen gestellt, um bei den nachfolgenden Hybridisierungsexperimenten die 6/94 ^{3}H-RNA als spezifische Probe einsetzen zu können. Insbesondere

sollten Verunreinigungen mit anderen Viren sowie mit zellulärer RNA ausgeschlossen werden. Es wurden deshalb zusätzliche Reinigungs- und Charakterisierungs-Schritte eingefügt. Ein typischer Reinigungsablauf der 6/94 Viren mit allen Kontrollen ist nachfolgend aufgezeigt.

Die Produktion von radioaktiv markierten Viren erfolgte hauptsächlich in Zellen vom Typ Cl-E-8. Die Zellen wurden in 490 cm^2 Rollerflaschen gezüchtet und mit ^{3}H-Adenosin, ^{3}H-Guanosin und ^{3}H-Uridin in Konzentrationen bis zu 60 µCi/ml markiert. Nach 7-tägiger Inkubation wurden die Zell-Überstände abgenommen, niedertourig abzentrifugiert und bis zur Virusreinigung eingefroren gesammelt.

Im ersten Schritt der Reinigung mußten die Viren konzentriert werden; dabei wurde gleichzeitig der größte Teil des Zellmediums mit den darin enthaltenen nichteingebauten ^{3}H-Nucleosiden entfernt. Für die Konzentrierung wurden je nach Weiterverwendung der Viren drei unterschiedliche Verfahren angewandt: Sedimentieren der Viren auf ein Sucrose-Kissen, Filtration des Zellüberstandes durch Ultrafiltrations-Membranen und Pelletieren der Viren im Winkelrotor. Da die Viren bei der letztgenannten Methode sehr stark zusammengepreßt werden und dabei Oberflächenstrukturen beschädigt werden, wurde diese Technik nur eingesetzt, wenn ausschließlich RNA aus den Viruspartikeln isoliert werden sollte. Wenn dagegen serologische und morphologische Untersuchungen an den Viren durchgeführt wurden, mußten die schonenderen Verfahren angewendet werden, wobei Ultrafiltration und Konzentrierung auf Sucrose-Kissen keine erkennbaren Unterschiede zeigten.

Als zweiter Schritt der Virusreinigung schließt sich die Entfernung von nichtviralen Proteinen und Nucleinsäuren an, die von zerstörten Zellen oder aus dem FKS stammen. Hierzu wurde einheitlich ein Stufengradient aus 25%iger und 60%iger Sucrose verwendet. Die Viren sedimentieren während der Zentrifugation durch die erste Sucrose-Schicht auf das Kissen aus 60%iger Sucrose, während die zellulären Verunreinigungen nicht in die 25%ige Sucrose-Schicht eindringen können. Der Effekt dieses Reinigungsschrittes ist deutlich daran zu er-

kennen, daß die Hauptmenge des auf den Gradienten aufgetragenen Materials eine dicke Bande auf der 25% Schicht bildet, während auf dem Sucrose-Kissen die Virusbande wesentlich schwächer zu sehen ist.
Im nächsten Reinigungsschritt wurden die Viren in einem kontinuierlichen Sucrosegradienten in ihrem Dichtebereich bandiert. Je nach Präparation zeigten sich ein oder zwei dicht beieinander liegende Virusbanden. Eine Refraktionsmessung in diesem Bereich ergab eine Dichte von 1,20-1,23 g/cm^3, die für das 6/94 Virus typisch ist (Lewandowski et al.1976). Das Auftreten der zweiten Virusbande ist durch leichtere, inkomplette 6/94 Viren zu erklären, die auch bei diesem Virus gefunden wurden (Loh, pers.Mitteilung). Die Virusschicht wurde aus dem Gradienten entnommen und nach Verdünnen mit Pbs$^-$-Puffer wurden die Viren pelletiert. Das entstandene Sediment wurde in Puffer resuspendiert; damit ist die Reinigung der 6/94 Viren abgeschlossen und es liegt eine "reine Virussuspension" vor (siehe Abbildung 29).
Mit Hilfe des Hämagglutinations-Hemmungstests konnte dann gezeigt werden, daß es sich bei dem gereinigten Isolat um 6/94 Viren handelt. Von dem "Parainfluenza-1" Kontrollserum der Behring-Werke wurde eine Verdünnungsreihe in 2er Schritten in Mikrotiterplatten angelegt. Die 25 µl jeder Serumverdünnung wurden mit 4 hämagglutinierenden Einheiten 6/94 Virus (in 25 µl) gemischt und für eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. 60 min. nach Zugabe von Erythrozyten-Suspension konnte der Test abgelesen werden. In einem Vergleichstest wurde homologes Kontrollantigen eingesetzt. Es zeigten sich die gleichen Ergebnisse beim HAH-Test mit 6/94 und mit Parainfluenza-1 Kontrollantigen; beide Virusarten reagierten gleich gut mit den im Serum enthaltenen Antikörpern, sie sind also serologisch weitgehend identisch. Der von den Behring-Werken als Parainfluenza-1 Antigen verwendete Stamm Sendai D 52 wird auch mit Sendai-Fushimi bezeichnet und ist serologisch vom 6/94 Virus nicht zu unterscheiden (Lief et al.1975). Er kann deshalb zur Charakterisierung der 6/94 Präparationen herangezogen werden. Die in der gereinigten Virussuspension enthal-

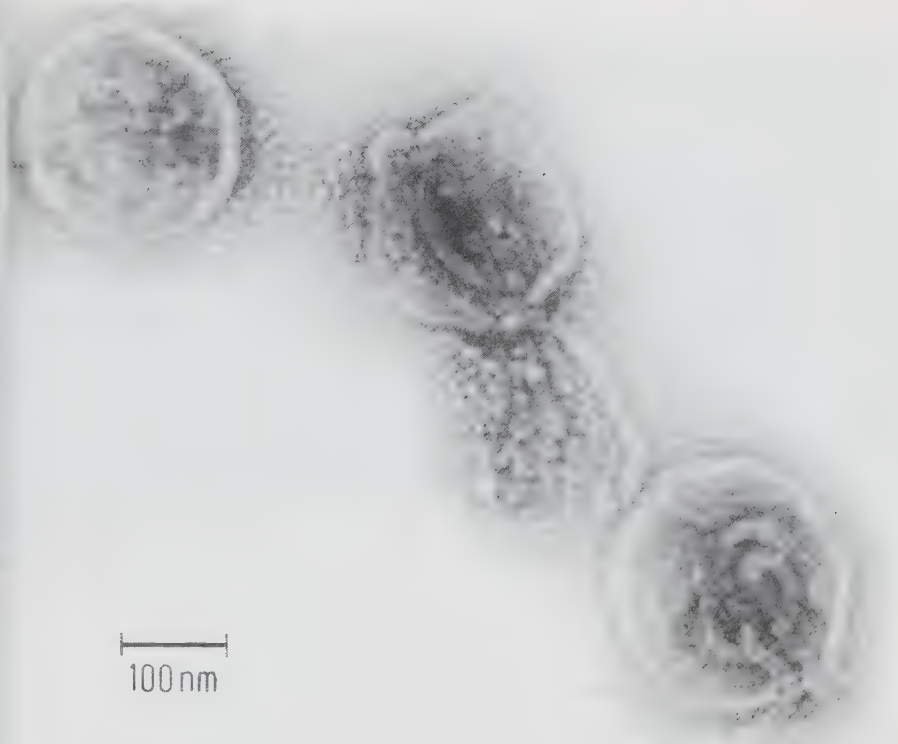


Abb. 25: Elektronenmikroskopische Aufnahme von 6/94 Viren nach Abschluß der Reinigung.

Gereinigtes 6/94 Virus wurde nach dem letzten Pelletierungsschritt in SSC-Puffer aufgenommen und in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt. Die negativ-Kontrastierung erfolgte mit 2%-igem Uranyl-Formiat in Wasser. Elektronenoptische Vergrößerung 50 000.

tenen hämagglutinierenden Viren gehören damit dem Serotyp'humane Sendai'Viren an. Da außer mit dem 6/94 Virus nicht mit infektiösen Sendai Viren gearbeitet wurde, konnte auf eine weitergehende intratypische Serodifferenzierung des gereinigten Virus verzichtet werden.

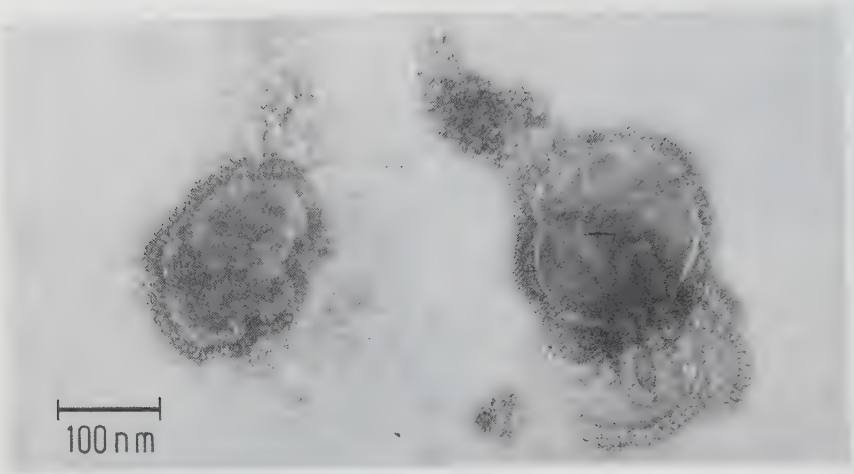


Abb. 26: Elektronenmikroskopische Aufnahme von 6/94 Viren.

Gereinigtes 6/94 Virus wurde mit 2%igem Uranylformiat in H_2O negativ kontrastiert. Elektronenoptische Vergrößerung 50 000.

Durch die nachfolgende elektronenmikroskopische Untersuchung der Virus-Präparationen konnte auch eine Verunreinigung mit nicht hämagglutinierenden Viren mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden. Dazu wurden stichprobenweise Aliquots aus den gereinigten 6/94 Präparationen entnommen; nach negativer Kontrastierung konnten die Viren im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. (Abbildung 25)
Die gezeigten Viren stellen einen Ausschnitt aus einer 6/94 Isolierung dar. Die sphärischen Viruspartikel zeigen das für Paramyxoviren typische Aussehen; ihre Größe variiert etwas. Dies hängt damit zusammen, daß sich in jeder Präparation auch inkomplette kleinere Viren befinden und selbst Viren mit gleichem s-Wert noch etwas in den Dimensionen streuen (Kingsbury et al.1970a). Im übrigen zeigen die 6/94 Viren den charakteristischen Aufbau mit Envelope und Nucleocapsid. Einzelheiten der äußeren Hülle und des Cores sind in den folgenden Abbildungen 26 und 27 dargestellt.
In der Abbildung 26 sind Feinstrukturen in der äußeren Virus-

Abb. 27: Ausschnitt aus dem Nucleocapsid des 6/94 Virus.

Negativ-Kontrastierung mit Uranyl-Formiat. Elektronenoptische Vergrößerung 100 000.

hülle besonders gut zu erkennen. Es handelt sich dabei um das virale Protein Hämagglutinin-Neuraminidase; dieser für die Adsorption und Elution von Erythrozyten wichtige virale Bestandteil umgibt das Viruspartikel als ein dichter Gürtel und ist auf Spikes angeordnet. Das linke in der Abbildung 26 gezeigte Viruspartikel ist durch die EM-Präparation etwas beschädigt; dabei ist ein Teil des viralen Nucleocapsids herausgetreten. Dieses erinnert, wie in Abbildung 27 in stärkerer Vergrößerung zu sehen ist, an den Aufbau des Tabak-Mosaik-Virus: Um einen Hohlkanal aus RNA sind Proteinuntereinheiten dicht angeordnet. Der Durchmesser beträgt etwa 18 nm. Diese typische Struktur des helikalen Nucleocapsids der Paramyxoviren dient auch als Erkennungsmerkmal bei Untersuchungen von Patientengewebe auf versteckte Viren.
Da in den Viruspräparationen nur Partikel mit dem gezeigten Aussehen gefunden wurden und diese Viren sich serologisch wie

das 6/94 Virus verhielten, konnten die gereinigten Viren als Ausgangsmaterial für die Isolation von 6/94 ^{3}H-RNA verwendet werden.

3.4.2. Isolierung von viraler 6/94 ^{3}H-RNA

Aus den gereinigten 6/94 Viren wurde nun die Nucleinsäure extrahiert. Dies geschah mit dem bereits beschriebenen SDS/Pronase Verdau, anschließender SDS/Phenol Extraktion und Alkohol-Fällung. Die isolierte 6/94 RNA wurde durch Messung eines kontinuierlichen UV-Spektrums auf ihre Reinheit überprüft.
Als nächster Schritt wurde die spezifische Aktivität der gereinigten viralen ^{3}H-RNA bestimmt. Dazu wurden die säurefällbaren Counts eines Aliquots gemessen und zur bestimmten RNA-Menge in Beziehung gesetzt. Es ergaben sich Werte von 1×10^{5} cpm/ 1 µg bis zu 5×10^{5} cpm/ 1 µg ^{3}H-RNA bei guten Präparationen. Aufgrund der geringen Nucleinsäuremenge ist diese Messung mit einem gewissen Fehler behaftet.
Vor Verwendung für Hybridisierungsexperimente wurde von der biochemisch hochgereinigten viralen ^{3}H-RNA noch der Anteil an niedermolekularen Nucleinsäuren abgetrennt. Dies geschah, obwohl durch die aufwendige Reinigung der aus Zellüberständen isolierten Viren ein Mitschleppen von zellulärer RNA außen an den Viruspartikeln weitgehend ausgeschlossen werden konnte; auch liegen für Paramyxoviren bisher keine Hinweise dafür vor, daß sie zelluläre RNA beim Budding-Prozeß mit in das Viruspartikel packen. Durch Sedimentation in einem linearen Sucrose Gradienten wurde von der viralen gesamt-RNA die hochmolekulare 50s RNA abgetrennt (Abbildung 28).
Bei der Abtrennung der viralen 50s RNA mußten erhebliche Reinigungsverluste in Kauf genommen werden, da RNA aus inkompletten Viren mit s-Werten um 20s, virale mRNA und bei der Präparation degradierte virale RNA weggereinigt wurden. Die Verluste bei diesem Reinigungsschritt betrugen in der Regel um 50%. Die Fraktionen des Gradienten, die 6/94 ^{3}H-RNA mit s-Werten größer 35s enthielten, wurden gepoolt. Diese RNA

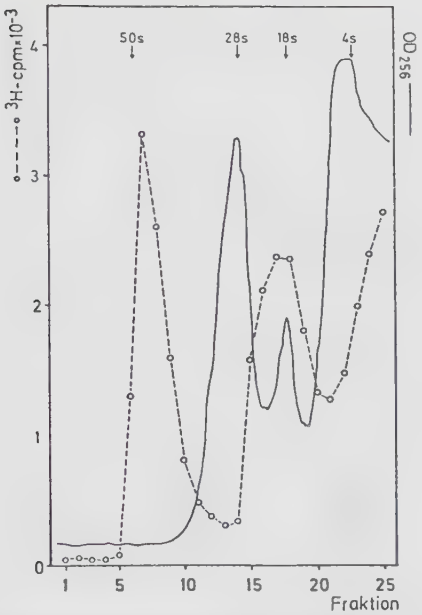


Abb. 28: Sedimentationsanalyse der aus gereinigten 6/94 Viren isolierten RNA.
Optisch reine ^{3}H-RNA aus 6/94 Viren wurde auf einen kontinuierlichen Gradienten von 5-20% Sucrose in STE mit 0,1% SDS überschichtet und im Rotor SW 56 der Beckman-UZ für 80 min. bei 17 °C, 45 000 rpm sedimentiert. Auf einem unter identischen Bedingungen präparierten Parallelgradienten wurden als Marker 100 µg ribosomale RNA aus HeLa-Zellen zentrifugiert. Die Gradienten wurden nach dem Lauf von unten angestochen; der Gradient mit 6/94 ^{3}H-RNA wurde in 25-30 Fraktionen aufgeteilt und von je einem Aliquot die säurefällbare Aktivität bestimmt (2.5.2.). Bei dem Markergradienten wurde mit einem LKB-Uvicord Durchlaufspektralphotometer die optische Dichte bei 256 nm bestimmt. Angegeben ist die säurefällbare Aktivität von jeder Fraktion des Gradienten mit ^{3}H-RNA (--o--o--), sowie die kontinuierlich gemessene OD_{256} des Markergradienten. Die Pfeile geben die sich aus dem Markergradienten ergebenden Positionen für 4s, 18s, 28s und 50s RNA an.

wurde dann einem DNase-Verdau unterzogen. Damit sollten mögliche Kontaminationen mit hochmolekularer DNA zellulären Ursprungs entfernt werden; solche Verunreinigungen sind schon bei einigen anderen RNA-Viren beschrieben worden, z.B. bei VSV (Kingsbury et al.1974), bei AMV (Deeney et al.1976) und

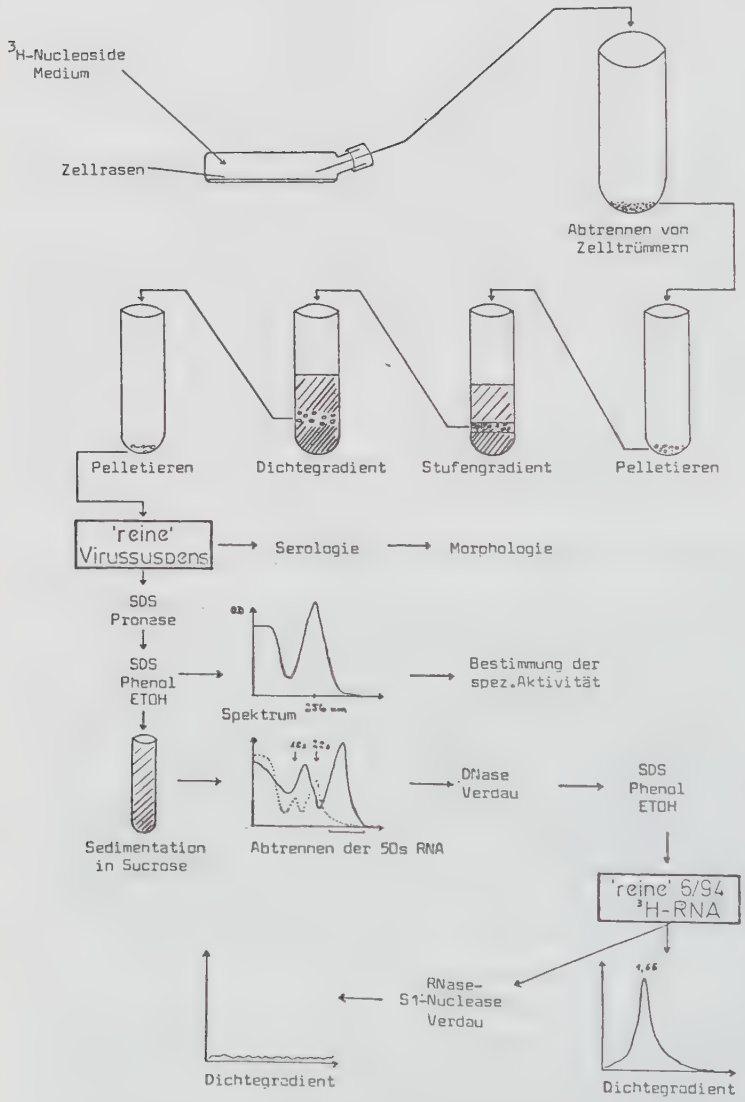


Abb. 29: Überblick über Isolierung, Reinigung und Charakterisierung der 6/94 ^{3}H-RNA.

bei Influenza-Viren (Kantorovich-Prokundina et al.1978). Durch Vorversuche war sichergestellt worden, daß durch die verwendete DNase (Worthington) die 6/94 ^{3}H-RNA nicht merklich geschädigt wird. Die Inkubation erfolgte in Gegenwart von 25 mM Mgac bei 37^{o}C für 60 min. mit 50 µg Enzym/ml. Anschließend wurde der Reaktionsansatz durch SDS/Phenol/Äthanol-Behandlung von Enzymproteinen und abgespaltenen Oligonucleotiden gereinigt. Die 6/94 ^{3}H-RNA wurde in Puffer eingefroren in Aliquots bei -20^{o}C aufbewahrt.
Die Isolierung, Reinigung und Charakterisierung der 6/94 Viren sowie die Extraktion der viralen gesamt-RNA und Abtrennung der 50s RNA sind in der Abbildung 29 nochmals zusammengefaßt dargestellt. Die in der letzten Zeile der Abbildung angedeuteten Experimente zur weiteren Charakterisierung der 6/94 RNA sind im nächsten Abschnitt beschrieben.
Der in 3.4.1. und 3.4.2. geschilderte Reinigungsweg der Virus-RNA macht deutlich, daß man die isolierte 6/94 ^{3}H-RNA als hochspezifische Hybridisierungsprobe zum Nachweis von viralen DNA-Sequenzen in den drei Fusionszell-Linien einsetzen kann.

3.4.3. Charakterisierung der gereinigten 6/94 ^{3}H-RNA

Vor Verwendung der 6/94 ^{3}H-RNA zum Nachweis von virusspezifischen DNA Sequenzen durch Hybridisierungsexperimente mußte noch ihr Verhalten gegenüber verschiedenen Nucleasen sowie ihre Schwimmdichte im Cs_2SO_4-Gradienten bestimmt werden. Zunächst wurde die Sensitivität der 6/94 RNA gegenüber der im ersten Teil der Arbeit bereits verwendeten Nuclease S1 sowie gegenüber pankreatischer RNase A überprüft. Die Abbildung 30 zeigt das Resultat dieses Versuches.
Die 6/94 ^{3}H-RNA ist durch Nuclease S1 nicht vollständig verdaubar; nach 20 min. Inkubation verbleibt noch eine säurefällbare Radioaktivität von rund 50%. Diese hohe Resistenz gegenüber der einzelstrang-spezifischen Nuclease ist durch die hohe Sekundärstruktur der RNA zu erklären, da das Enzym unter identischen Bedingungen einzelsträngige Nucleinsäure quantitativ abzubauen vermag (siehe 3.1.2.). Im Gegensatz

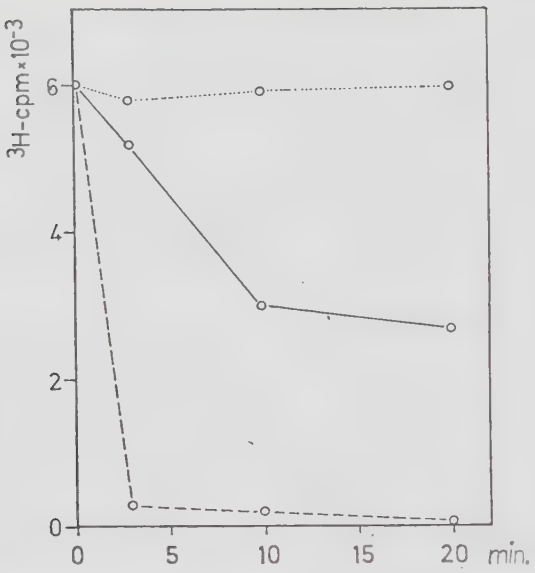


Abb. 30: Enzymatischer Verdau der 6/94 ^{3}H-RNA durch Nuclease-S1 und RNase A.

Je 30 000 cpm gereinigte 6/94 ^{3}H-RNA wurden in 100 µl Parallelansätzen a) nur mit STE-Puffer (—o···o—) b) mit 0,5 U S1-Nuclease in S1-Puffer (—o—) c) mit 20 µg/ml RNase A (– –o– –) bei 37 °C bzw. 45 °C (S1-Nuclease) inkubiert. Nach 0, 2, 5, 10 und 20 min. wurde je ein 20µl Aliquot entnommen und die säurefällbare Radioaktivität bestimmt. Angegeben ist die Nuclease-resistente Aktivität der RNA und eine Kontrollkurve in Abhängigkeit von der Zeit.

dazu wird die virale RNA durch pankreatische RNase A in kurzer Zeit vollständig abgebaut; die im Kontrollansatz ohne Nuclease inkubierte RNA zeigt keine signifikante Veränderung.
Als zweiter Punkt mußte die Schwimmdichte der 6/94 ^{3}H-RNA im Dichtegradienten bestimmt werden. Gleichzeitig wurde in einem Parallelexperiment untersucht, wie hoch die Background-Aktivität der viralen ^{3}H-RNA nach Nuclease Verdau im Cs_2SO_4-Gradienten ausfallen würde. Abbildung 31 gibt über die Ergebnisse dieser Versuche Auskunft.
Die 6/94 ^{3}H-RNA bandiert im Cs_2SO_4-Dichtegradienten in dem für einzelsträngige RNA typischen Bereich um 1,66 g/cm^3. Im

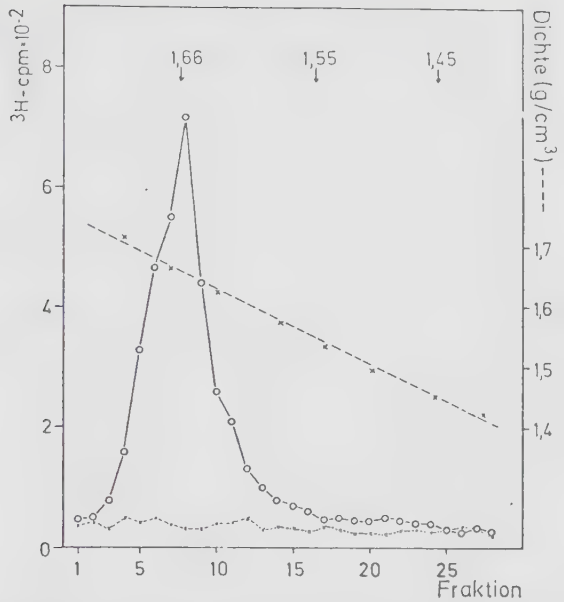


Abb. 31: Bestimmung der Dichte-Position der 6/94 ^{3}H-RNA im Cs_2SO_4-Dichtegradienten und der nach Nuclease-Verdau verbleibenden Restaktivität.

6 000 cpm 6/94 ^{3}H-RNA wurden mit 8 ml Cs_2SO_4-Lösung in STE, Ausgangsdichte 1,55 g/cm^3, gemischt. In einem Parallelversuch wurden 6 000 cpm 6/94 ^{3}H-RNA zunächst für 60 min. mit 20 µg/ml RNase und 5 U S1-Nuclease/ml in S1-Puffer bei 45 °C inkubiert und dann mit 8 ml Cs_2SO_4-Lösung gemischt. Zu beiden Nucleinsäureproben wurden je 100 µg t-RNA zugesetzt und die Proben im Ti 50 Rotor bei 15 °C und 40 000 rpm für 66 Std. zentrifugiert. Die Gradienten wurden von unten angestochen und fraktioniert. Von jeder 3. Fraktion wurde der Brechungsindex bestimmt, und in jeder Fraktion die säurefällbare Radioaktivität (2.5.2.). Angegeben ist die aus den Refraktionswerten errechnete Dichtegerade (2.8.1.) sowie die säurefällbare Radioaktivität der einzelnen Fraktionen. 6/94 ^{3}H-RNA (--o--o--), 6/94 ^{3}H-RNA nach Nuclease-Verdau (--x--x).

Hybrid-Bereich bei 1,55 g/cm^3 und im DNA-Dichtebereich um 1,45 g/cm^3 ist nur die Background Aktivität zwischen 20 und 40 cpm zu finden. Daraus folgt, daß es sich bei der 6/94 ^{3}H-RNA um einzelsträngige RNA ohne DNA Verunreinigungen handelt.
Ganz anders sieht das RNA Profil nach Nuclease Verdau aus.

Höhere Aktivität tritt im Dichtegradienten nicht mehr auf, es findet sich ein gleichförmiger Background um 20-30 cpm. Somit kann man für die 6/94 ^{3}H-RNA abschließend folgende Aussagen machen: Als Ausgangsmaterial für die RNA-Extraktion dienen aus Zellüberständen gewonnene, gereinigte, serologisch und morphologisch charakterisierte Viruspartikel; aus der isolierten viralen gesamt-RNA wird die 50s Genom-RNA abgetrennt:Damit ist die Spezifität der 6/94 ^{3}H-RNA gewährleistet. Diese RNA wird den bei der Analyse von Nucleinsäuren üblichen Tests unterzogen und erweist sich dabei als eine Nuclease-sensitive Einzelstrang RNA ohne DNA-Verunreinigung: Damit sind alle Voraussetzungen geschaffen, die 6/94 ^{3}H-RNA als hochspezifische Hybridisierungsprobe zum Nachweis von virusspezifischen DNA Sequenzen in den drei Fusionszell-Linien einzusetzen. Diese Versuche werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.4.4. Modellhybridisierung zur Etablierung eines Nachweissystems für virusspezifische DNA Sequenzen

Bevor der Nachweis von virusspezifischen DNA Sequenzen in den drei Zell-Klonen begonnen werden konnte, mußte zunächst durch Modellhybridisierungen ein geeignetes System etabliert werden. Dazu wurde die homologe Hybridisierung von ^{3}H-RNA aus Cl-E-8 Zellen mit der DNA der gleichen Zellen ausgewählt. Bei diesen Experimenten waren positive Resultate zu erwarten. Anfängliche Hybridisierungsversuche erfolgten mit auf Filtern immobilisierter Cl-E-8 DNA und entsprechender ^{3}H-RNA (Gillespie et al.1965). Dann wurde auf das bereits erprobte Flüssig-Hybridisierungssystem mit Formamid zurückgegriffen, welches auch andere Autoren bei ähnlichen Fragestellungen einsetzen (Axel et al.1972, Varmus et al.1973, Zhdanov 1977). Neu war bei den nun vorliegenden Experimenten verglichen mit den cDNA/RNA Hybridisierungen, daß sich die gesuchten DNA Sequenzen in einem sehr großen Überschuß an unspezifischer DNA befanden. Dadurch ergab sich eine ungünstige Nachweissituation:

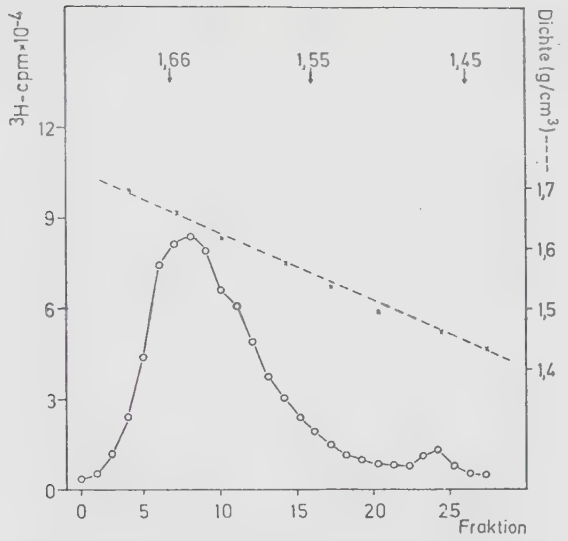


Abb. 32 : Dichtegradientenanalyse der homologen Hybridisierung von Cl-E-8 ^{3}H-RNA mit DNA aus den gleichen Zellen.

400 000 cpm (ungefähr 3,5 µg) Cl-E-8 ^{3}H-RNA wurde mit 50 µg DNA aus Cl-E-8 Zellen in einem 50 µl Hybridisierungsansatz inkubiert. (Näheres dazu in der Legende der vorherigen Abbildung). Nach Beendigung der 4-tägigen Inkubation bei 37 °C wurde der Hybridisierungsansatz mit 100 µg t-RNA und 8 ml Cs_2SO_4-Lösung in STE (Dichte 1,55 g/cm^3) gemischt und im Ti 50 Rotor für 66 Std. bei 15 °C, 40 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient von unten angestochen und fraktioniert. Die Bestimmung der Dichte der einzelnen Fraktionen erfolgte durch Messung der Refraktion, die Bestimmung der Position der Nucleinsäuren durch Messung der säurefällbaren Radioaktivität.

In die Hybridisierungsansätze konnten aus Gründen der Viskosität nur bestimmte Höchstmengen an DNA eingesetzt werden, die dann wieder die Anzahl der gesuchten Sequenzen und damit die zu erwartende Hybridaktivität begrenzten. Abbildung 32 zeigt das Ergebnis einer homologen Modellhybridisierung von Cl-E-8 DNA mit Cl-E-8 ^{3}H-RNA.

Die Dichtegradientenanalyse dieses Versuches ergibt, daß neben der Hauptaktivität im RNA-Bereich, die durch ungebundene Cl-E-8 RNA bedingt ist, auch im Hybrid-Bereich und im DNA Dichtebereich Aktivität zu messen ist. Da diese Aktivität auf eine

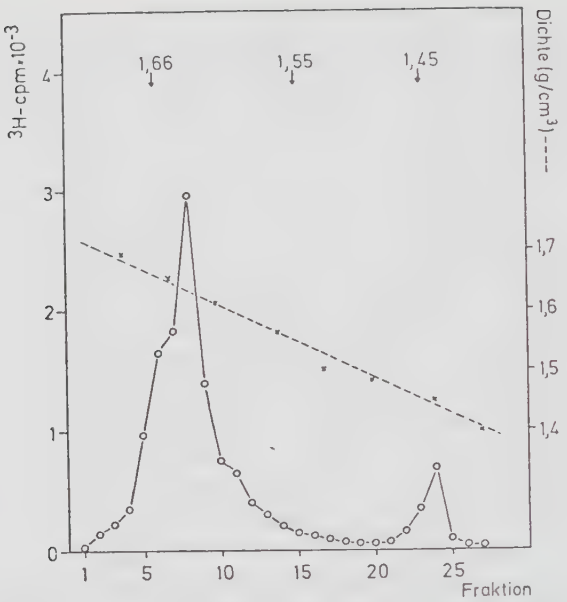


Abb. 33: Analyse der Hybridisierungsprodukte aus 6/94 ^{3}H-RNA und DNA aus Cl-E-8 Zellen im Cs_2SO_4-Dichtegradienten.

24 000 cpm (ungefähr 180 ng) 6/94 ^{3}H-RNA wurden in einem 50 µl Ansatz mit 40 µg Cl-E-8 DNA (Isolierung und Reinigung der DNA siehe Legende zu Abb. 36-38), 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 und 60% Formamid für 4 Tage bei 37 °C inkubiert. Dann wurde der Hybridisierungsansatz mit 8 ml Cs_2SO_4-Lösung in STE (Dichte 1,55 g/cm^3) und 100 µg t-RNA gemischt und im Ti 50 Rotor der Beckman-Zentrifuge für 66 Std. bei 15 °C, 40 000 rpm zentrifugiert. Nach dem Lauf wurden die Gradienten von unten abgenommen, fraktioniert und die säurefällbare Radioaktivität bestimmt (2.5.2.). Angegeben ist die aus den Refraktionswerten von jeder dritten Fraktion errechnete Dichtegerade sowie die Verteilung der säurefällbaren Aktivität.

erfolgte Hybridisierung hinweist, schien damit das Hybridisierungssystem ausreichend zu arbeiten und es wurden daraufhin Experimente mit Cl-E-8 DNA und 6/94 ^{3}H-RNA angesetzt. Bei den ersten Experimenten zeigten sich bereits Erfolge. Das Ergebnis eines dieser Versuche ist in Abbildung 33 dargestellt.

Bei dem Gradienten zeigt sich die überwiegende Aktivität im RNA-Bereich (1,66 g/cm^3). Zur Hybridposition (1,55 g/cm^3) hin nimmt die

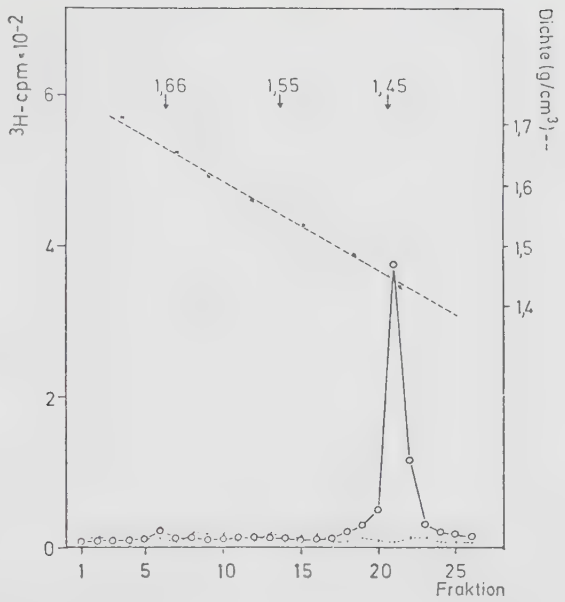


Abb. 34: Bestimmung der Schwimmdichte des Nuclease-verdauten Hybrids aus 6/94 ^{3}H-RNA und Cl-E-8 DNA im Dichtegradienten.

In einem Hybridisierungsansatz (2.7.) wurden 20 000 cpm 6/94 ^{3}H-RNA mit 50 µg gereinigter Cl-E-8 DNA (siehe Legende zu Abb. 36-38) bei 37 °C für 4 Tage inkubiert. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 50 µl. Anschließend wurde der Hybridisierungsansatz mit 600 µl S1-Puffer, 2 U S1-Nuclease und 20 µg/ml RNase A gemischt und für 60 min. bei 45 °C inkubiert. Dann erfolgte die Bestimmung der Schwimmdichten im Cs_2SO_4-Dichtegradienten unter den bereits erwähnten Bedingungen (2.8.1.): Ti 50 Rotor, 42 000 rpm, 15 °C, 66 Std.. Nach Fraktionierung des Gradienten wurde bei den einzelnen Fraktionen die säurefällbare Radioaktivität (-o--o-) und die Dichte (-----) bestimmt. In einem Parallelexperiment wurde als Negativ-Kontrolle 6/94 ^{3}H-RNA mit DNA aus menschlichen HeLa-Zellen hybridisiert. Die mit Kreuzen gekennzeichnete Kurve (--x--x--) gibt das Ergebnis dieses Versuches wieder.

Aktivität dann deutlich ab; im DNA-Bereich bei 1,45 g/cm^3 ist wieder ein Ansteigen der gemessenen Impulse erkennbar. Aktivität im Hybrid- und DNA-Dichtebereich würde - eine korrekte Hybridisierung vorausgesetzt - andeuten, daß sich in den Cl-E-8 Zellen komplementäre Sequenzen zur ^{3}H-RNA, d.h. virus spezifische DNA Sequenzen befinden.

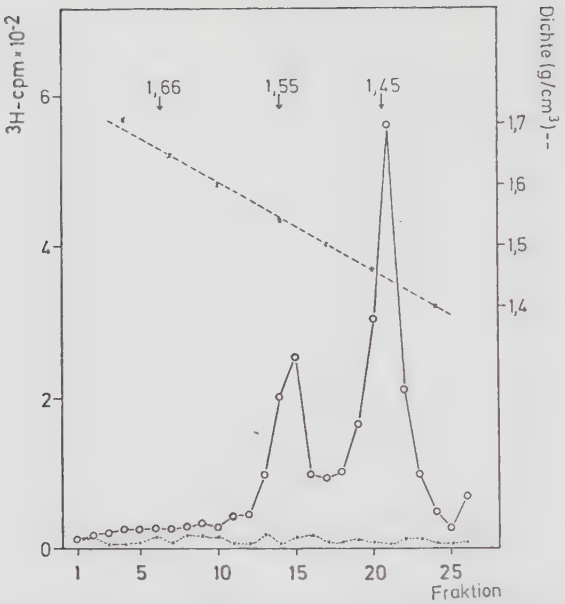


Abb. 35: Analyse des Hybridisierungsproduktes aus Cl-E-8 ^{3}H-RNA und Cl-E-8 DNA nach Nuclease-Verdau im Dichtegradienten.

50 µg Cl-E-8 DNA wurden mit 90 000 cpm Cl-E-8 ^{3}H-RNA unter den in der vorigen Abbildung angegebenen Bedingungen hybridisiert und mit S1-Nuclease/RNase verdaut. Dann wurden die Schwimmdichten der Nuclease-resistenten Nucleinsäuren im Cs_2SO_4-Dichtegradienten bestimmt. Angegeben ist die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen (--o--o--) und die dazugehörige Dichtegerade (-------), sowie die RNase-resistente Aktivität (--x--x--).

Um diese vorläufige Aussage zu erhärten, wurde in den folgenden Experimenten versucht, das Ergebnis der Hybridisierung durch Entfernen aller nichtgebundener ^{3}H-RNA eindeutiger zu machen. Die entsprechenden Versuche sind in den beiden Abbildungen 34 und 35 dargestellt.

Durch die kombinierte Nuclease S1/RNase A Behandlung des Hybridisierungsansatzes wird die gesamte nichteingebaute ^{3}H-RNA verdaut. Dadurch verschwindet der Hauptpeak im RNA Bereich, dessen Schulter bis in den Hybridbereich bei 1,55 g/cm^3 reichte und somit eine genaue Analyse in diesem Bereich unmöglich machte.

Das Nuclease-resistente Material aus der Hybridisierung von 6/94 ^{3}H-RNA mit Cl-E-8 DNA bandiert in einem Peak bei 1,45 g/cm^{3}. Das bedeutet, daß die entstandenen Hybridstrukturen überwiegend aus doppelsträngiger DNA bestehen, in der, bedingt durch Degradation der in diesem Vorversuch eingesetzten RNA, nur verhältnismäßig kurze RNA/DNA Hybridmoleküle enthalten sind. - Jedoch von entscheidender Bedeutung ist, daß auch nach Nuclease Verdau noch Hybrid Aktivität meßbar ist. Da die gereinigte 6/94 ^{3}H-RNA eine hochspezifische Hybridisierungsprobe ist, ist somit bewiesen, daß es in der aus Cl-E-8 Zellen isolierten DNA 6/94 spezifische Sequenzen gibt.

Die Spezifität dieser Nachweismethode wird durch das parallel durchgeführte Kontrollexperiment bestätigt. Bei der Analyse des Hybridisierungsproduktes aus 6/94 RNA und HeLa-DNA zeigt sich nach Nuclease Verdau in der Dichtegradientenanalyse nur gleichmäßig verteilte Background Aktivität. Dadurch kann man ausschließen, daß es sich bei der im DNA-Bereich gefundenen Aktivität der Hybridisierung von Cl-E-8 DNA mit 6/94 RNA um eine unspezifische Nucleinsäure-Aggregation handelt.

Bei der homologen Hybridisierung von Cl-E-8 DNA mit Cl-E-8 RNA zeigt sich nach Nuclease Verdau Aktivität im Hybrid- und im DNA-Bereich. Im Hybrid-Peak sind Moleküle mit gleich großem DNA- und RNA-Anteil enthalten. Die Aktivität im DNA-Bereich bei 1,45 g/cm^{3} ist durch Strukturen zu erklären, die aus DNA-Doppelstrang mit partiellen RNA/DNA Hybridbereichen bestehen. Die Dichte solcher Moleküle muß durch den RNA-Anteil höher sein als bei reiner Doppelstrang-DNA. Auch diese Aussage stimmt mit den gezeigten Resultaten überein.

Nachdem durch diese Vorversuche die Bedingungen für die Hybridisierung von zellulärer DNA mit viraler RNA erarbeitet waren und sich auch schon erste signifikante Hinweise für die Existenz von 6/94 spezifischer DNA in den Cl-E-8 Zellen ergeben hatten, wurden nun die Experimente zum Nachweis von virusspezifischer DNA mit allen drei Fusionszell-Linien durchgeführt.

3.4.5. Untersuchung der drei Fusionszell-Linien auf 6/94-spezifische DNA-Sequenzen

Nach dem erfolgreichen Abschluß der Modellhybridisierungen konnte nun die Untersuchung aller drei Fusionszell-Klone auf virusspezifische DNA Sequenzen beginnen. Dabei sollte geklärt werden, ob sich in allen drei Klonen 6/94 spezifische DNA als Hinweis auf ein latentes Virus befindet. Für die Zell-Linie Cl-E-8 hatte dies bereits in der Modellhybridisierung nachgewiesen werden können; dagegen war für die beiden anderen Zell-Klone das Ergebnis noch völlig offen, besonders für den Klon Cl-C-2, der bisher in keinem virusspezifischen Test ein positives Ergebnis gezeigt hatte.
Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde wieder die hochspezifische 6/94 ^{3}H-RNA als Hybridisierungsprobe eingesetzt. Aus allen drei Fusionszell-Klonen wurde DNA isoliert, durch Alkaliverdau von RNA-Verunreinigungen befreit und durch optische Messung im UV-Spektralphotometer auf ihre Reinheit überprüft. Zusätzlich wurde in einer parallelen Reinigung Cl-E-8 DNA, die mit ^{3}H-Thymidin radioaktiv markiert war, isoliert, durch enzymatischen Verdau mit den verschiedenen Nucleasen charakterisiert und im Cs_2SO_4-Dichtegradienten auf die typische Schwimmdichte von 1,45 g/cm^3 überprüft.
Zur Kontrolle der Hybridisierungsergebnisse auf unspezifische Effekte wurde darüber hinaus noch die DNA aus drei virusfreien Zell-Linien isoliert: aus menschlichen HeLa Zellen, aus Affennierenzellen (Vero-Zellen) und aus primären, embryonalen Hühnerfibroblasten. Mit der gereinigten DNA aus jeder dieser sechs Zell-Linien (drei Fusionszell-Linien und drei Kontrollzell-Linien) wurde dann die 6/94 ^{3}H-RNA im Hybridisierungsansatz mit 60% Formamid, 400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 und 2 mM EDTA inkubiert. Anschließend wurden die gesamten Ansätze mit RNase A/Nuclease S1 -Gemisch enzymatisch verdaut und die Nuclease-resistenten Hybride im Cs_2SO_4-Dichtegradienten zentrifugiert. In den Abbildungen 36 bis 38 sind die Ergebnisse dieser Hybridisierungsversuche wiedergegeben; zum Vergleich ist jeweils eine Kontrollhybridisierung mit eingezeichnet.

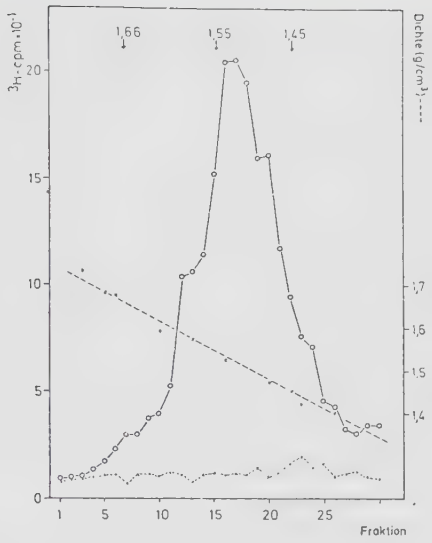


Abb. 36 : Analyse der Hybridisierung von 6/94 ^{3}H-RNA mit DNA aus C1-E-8 Fusionszellen im Cs_2SO_4-Gradienten.

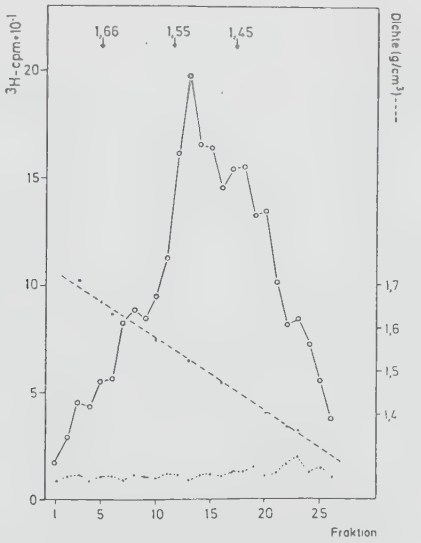


Abb. 37 : Dichtegradientenanalyse der Hybridisierungsprodukte von 6/94 ^{3}H-RNA mit C1-F-2 DNA.

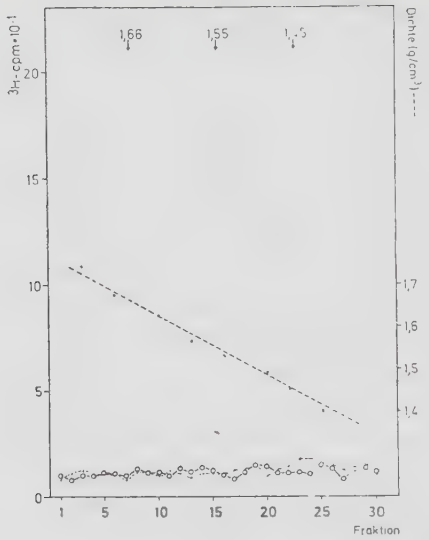


Abb. 38: Hybridisierung von 6/94 ^{3}H-RNA mit DNA aus Cl-C-2 Fusionszellen; Analyse der Nuclease-resistenten Hybridisierungsprodukte im Cs_2SO_4-Dichtegradienten.

Gemeinsame Legende zu Abb. 36 bis 38:
Zellen der drei Fusionszell-Linien Cl-E-8, Cl-F-2 und Cl-C-2 und Standard-Laborzellen der Typen Hela, Vero und primäre embryonale Hühnerfibroblasten wurden in Zellkultur vermehrt. Nach Erreichen eines geschlossenen Zellrasens wurden die Zellen mit Pbs^- gewaschen und mit einem Teflonschaber in Pbs^- von den Kulturgefäßen abgekratzt. Nach Abkühlen der Zellsuspension auf 4 °C wurden die Zellen durch niedertourige Zentrifugation mit 1.000 rpm in der Christ-Zentrifuge aus dem Puffer pelletiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen mit einem hypotonischen Lysopuffer für 5 min.; mit Hilfe eines Glashomogenisators wurde dann das Zell-Lysat 20mal homogenisiert. Nach Zugabe von 1/10 Volumen Puffer "Z" wurden die schnellsedimentierenden Zellteile durch Zentrifugation für 20 min. im SS 34 Rotor der Sorvallzentrifuge bei 10 000 rpm, 4 °C, abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 0,25 M Sucrose in STE resuspendiert. Durch weitere Zentrifugation im Tragringrotor der Christzentrifuge für 14 min. bei 5 000 rpm, 4 °C wurden die Kerne pelletiert und weitgehend von Zellmembranen etc. befreit. Das Pellet wurde dann in 2 ml STE aufgenommen und nach Zugabe von 20 µl 20%igem SDS und von 500 µg präinkubierter Pronase 3 Std. bei 37 °C im Wasserbad gehalten. Anschließend wurde durch SDS-Phenol-Behandlung die Nucleinsäure extrahiert und mit 2,5 Volumen Alkohol bei 300 mM NaCl im Tiefkühlschrank gefällt. Im folgenden Alkali-Verdau wurde die Nucleinsäure in STE mit 0,5 M KOH für 24 Std. bei 37 °C inkubiert und neutralisiert. Nach erneuter Alkoholfällung wurde die DNA in STE aufgenommen

und in Konzentration von 10 mg/ml bei 4 °C bis zu den Hybridisierungen aufbewahrt.
Bei den Hybridisierungsexperimenten wurden 5 µl 6/94 ^{3}H-RNA (25 000 cpm) und 100 µg der jeweiligen DNA in Gegenwart von 0,4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 20 mM EDTA und 60 % Formamid für 4 Tage bei 37 °C inkubiert. DNA und ^{3}H-RNA wurden gemeinsam vorher 10 min. bei 100 °C präinkubiert und dann schnell auf 0 °C abgekühlt. Der gesamte Hybridisierungsansatz wurde mit 5 U S1-Nuclease und 20 µg/ml RNase A in 600 µl S1-Puffer bei 45 °C für 60 min. verdaut. Anschließend wurde Cs_2SO_4 in STE zugegeben und die Dichte auf 1,55 g/cm^3 eingestellt. Die Zentrifugation erfolgte im Ti 50 Rotor für 66 Std. bei 40.000 rpm, 15 °C. Die Gradienten wurden von unten angestochen und in 25-30 gleiche Fraktionen geteilt. Bei jeder 3. Fraktion wurde die Refraktion gemessen und die daraus resultierende Dichtegerade (-----) ermittelt. Die säurefällbare Radioaktivität (--o--o--) wurde von jeder Fraktion ermittelt (2.5.2.). In Parallelgradienten wurden die unter identischen Bedingungen inkubierten Hybridisierungsprodukte der Kontroll-DNAs analysiert. Für sie ist stellvertretend das Ergebnis der Hybridisierung von 6/94 ^{3}H-RNA mit Vero-Zell DNA angegeben (--x--x-).

Die Experimente zeigen, daß in den Zellen vom Typ Cl-E-8 und Cl-F-2 virusspezifische DNA enthalten ist, die mit der 6/94 ^{3}H-RNA Nuclease-stabile Hybride bildet. Diese beiden Zell-Linien erwiesen sich zwar schon serologisch und immunologisch als virusinfiziert, mit Hilfe der 6/94 ^{3}H-cDNA konnten virusspezifische RNA-Sequenzen und durch direkte Markierung der viralen RNA auch virale polyadenylierte RNA nachgewiesen werden; die Existenz von 6/94 spezifischen DNA Sequenzen in Gehirnzellen einer M.S.-Patientin läßt jedoch auf einen bisher unbekannten Mechanismus schließen, mit dessen Hilfe Paramyxoviren ihre RNA in eine DNA-Kopie umschreiben, die dann das latente Virus in der Zelle repräsentiert.
Die Radioaktivität der Nuclease-resistenten Hybride bandiert im Dichtegradienten zwischen dem Hybrid-Bereich (1,55 g/cm^3) und dem DNA-Bereich, ihr Maximum tendiert stärker zum Hybrid-Bereich. Das heißt, es liegt hier eine heterogene Population von Hybridmolekülen vor, deren DNA/RNA Verhältnis schwankt. Dies kann durch unterschiedlich lange DNA-Moleküle oder durch degradierte RNA bedingt sein. Die wiedergefundene Aktivität liegt zwischen 5 und 10% der eingesetzten 6/94 ^{3}H-RNA; dabei sind Verluste durch unspezifische Aktivitäten der Nuclease sowie durch die Dichtezentrifugation nicht berücksichtigt.

Die Spezifität der Hybridisierung wird durch das Kontrollexperiment mit DNA aus Vero-Zellen nachgewiesen: Bei diesem Versuch zeigt sich nach Nuclease-Verdau des Hybridisierungsansatzes nur Background-Aktivität im Gradienten. Die im Schnitt zwischen 10 und 20 cpm liegende Restaktivität macht deutlich, daß durch die verwendete Säurefällung nichtgebundene Nucleosid-Monophosphate quantitativ abgetrennt werden.
Die weiteren Kontroll-Hybridisierungen mit DNA aus HeLa-Zellen und embryonalen Hühnerfibroblasten ergaben ähnliche Profile mit Aktivitäten zwischen 10 und 20 cpm pro Fraktion und sind deshalb nicht noch zusätzlich gezeigt.
Auch für die Hybridisierungsexperimente mit DNA aus Cl-C-2 Zellen und 6/94 ^{3}H-RNA ergibt sich ein eindeutiges Ergebnis: Nachdem in diesem Zell-Klon keine virusspezifische RNA mit Hilfe der 6/94 ^{3}H-cDNA nachgewiesen werden konnte, hatte sich die Frage gestellt, ob in diesen Zellen vielleicht latente Viren in Form einer DNA-Sequenz enthalten sein könnten. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist dies nicht der Fall. Die im Dichtegradienten nach Nuclease-Verdau noch auffindbare Aktivität entspricht im Rahmen der experimentellen Schwankungen der negativen Kontroll-Hybridisierung mit Vero-Zell DNA.

Zur weiteren Absicherung dieser Hybridisierungsergebnisse wurden von den Hybriden aus Cl-E-8 bzw. Cl-F-2 DNA und 6/94 ^{3}H-RNA Schmelzpunkt-Bestimmungen durchgeführt. Die entsprechenden Resultate sind in der Abbildung 39 zusammengefaßt.
Für beide Hybride ergeben sich Schmelzpunkte zwischen 85°C und 90°C, für Cl-E-8 bei 88°C und für Cl-F-2 bei 86°C. Damit ist ein weiterer Nachweis erbracht, daß es sich bei diesen Hybriden um stabile und vollständig basengepaarte Strukturen handelt.
In weiteren Experimenten wurde mit einer ^{32}P-markierten 6/94 RNA als Hybridisierungsprobe die Untersuchung auf virusspezifische DNA-Sequenzen in den Fusionszellen und Kontrollzellen wiederholt. Die ^{32}P-Markierung wurde gewählt, um mit diesen Versuchen die Hybridisierungsergebnisse mit ^{3}H-RNA gegen unspezifische Tritium-Effekte (z.B. Tritiumaustausch)

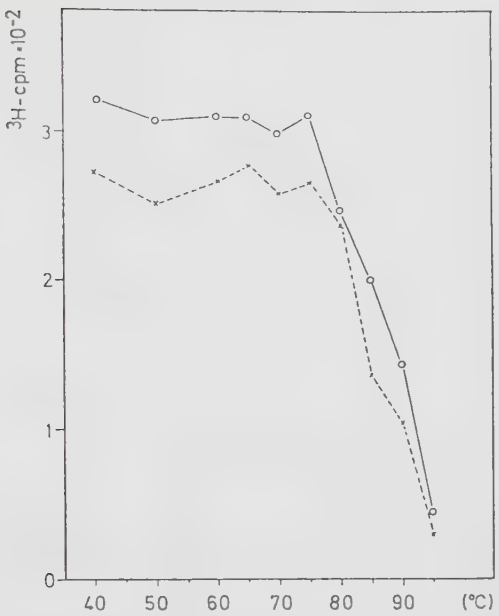


Abb. 39 : Schmelzkurve der Hybridisierungsprodukte aus 6/94 ^{3}H-RNA und DNA von Cl-E-8 bzw. Cl-F-2 Zellen.

100 µg gereinigte DNA aus Cl-E-8 und Cl-F-2 Zellen wurden mit je 25 000 cpm 6/94 ^{3}H-RNA im Hybridisierungsansatz (2.7.) für 4 Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit SSC auf 400 µl verdünnt und mit Äthanol (0,4 M NaCl) bei -20 °C gefällt. Die gefällte Nucleinsäure wurde abzentrifugiert, getrocknet, in 100 µl SSC aufgenommen und in Eppendorfgefäße zu je 10 µl aliquotiert. Die Proben wurden im Wasserbad bei den angegebenen Temperaturen (±1 °C) für 2,5 min erhitzt, dann sofort mit 200 µl eiskaltem S1-Puffer mit 1 U Nuclease-S1/ 20 µg/ml RNase A gemischt und für 60 min. bei 45 °C inkubiert. Die säurefällbare Aktivität wurde bestimmt (2.5.2.) und gegen die angewandte Schmelztemperatur aufgetragen.

Cl-E-8 (--o--o--) Cl-F-2 (--x--x--)

abzusichern. Die Abbildungen 40 bis 42 zeigen, daß dieses Ziel voll erreicht werden konnte.

Die Ergebnisse dieser mit 6/94 ^{32}P-RNA als Hybridisierungsprobe durchgeführten Experimente bestätigen die vorher gezeigten Resultate der Versuche mit Tritium-markierter 6/94 RNA: Hybridisierungen mit DNA aus Cl-E-8 und Cl-F-2 Zellen ergeben eine

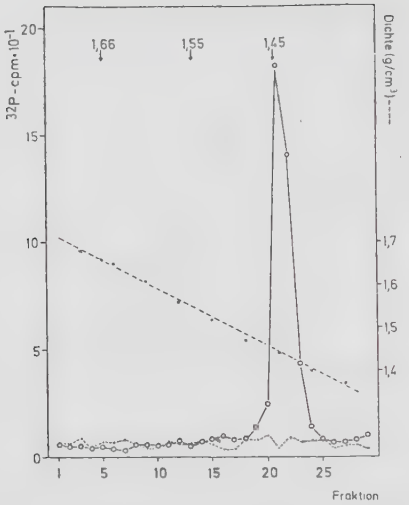


Abb. 40: Hybridisierung von DNA aus Cl-E-8 Zellen mit ^{32}P markierter 6/94 RNA, Analyse der Hybride nach Nuclease-Verdau im Dichtegradienten (--o--o--), Kontrollhybridisierung mit unspezifischer DNA aus Vero-Zellen (--x--x-).

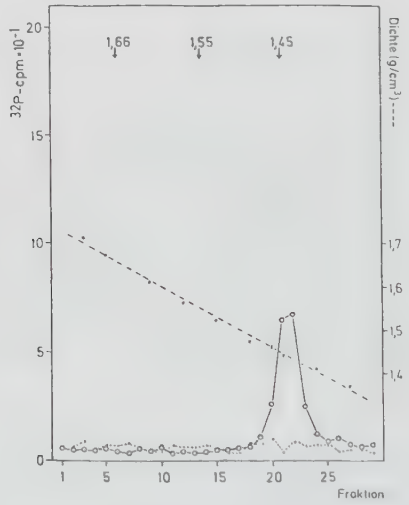


Abb. 41: Dichtegradientenanalyse des Hybridisierungsprodukts aus Cl-F-2 DNA mit 6/94 ^{32}P-RNA nach Nuclease-Verdau (--o--o--), Kontrollhybridisierung mit unspezifischer DNA aus Vero-Zellen (--x--x--).

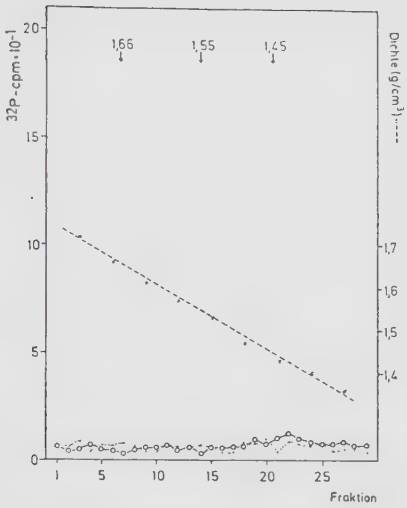


Abb. 42: Analyse der Nuclease-resistenten Hybride aus 6/94 ^{32}P-RNA und DNA aus Cl-C-2 Zellen im Dichtegradienten (--o--o--), Kontrollhybridisierung mit unspezifischer Vero-Zell DNA (--x--x-).

Bei einer dichtgewachsenen Rollerflasche (490 cm^2) mit Cl-F-2 Zellen wurde das Standard-Medium gegen 10 ml phosphatfreies MEM-F 15 mit 5% dialysiertem FKS ausgetauscht. Dann wurde 1 mCi ^{32}P zugegeben und die Kultur für 24 Std. bei 33 °C weiter inkubiert. Nach erneutem Mediumwechsel mit 1 mCi ^{32}P wurden nach weiterer Inkubation für 24 Std. die gesammelten Überstände einer Virusreinigung unterzogen und die 6/94 ^{32}P-RNA isoliert, wie bei Abb. 36-38 beschrieben wurde. In die Hybridisierungsansätze (2.7.) wurden je 50 µg DNA der Fusionszell-Linien bzw. aus HeLa-Zellen, embryonalen Hühnerfibroblasten sowie Vero-Zellen und je 3 500 cpm gereinigte 6/94 ^{32}P-RNA eingesetzt und für 3 Tage bei 41 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit Nuclease verdaut und die Position der resistenten Hybride im Dichtegradienten bestimmt (siehe Legende zu Abb. 36-38). Angegeben ist die aus den Refraktionswerten errechnete Dichtegerade (2.8.1.) sowie die säurefällbare Aktivität von jeder Fraktion (-o--o-). Zum Vergleich ist jeweils die Kontrollhybridisierung mit DNA aus Vero-Zellen angegeben (--x--x--).

signifikante Aktivität von Nuclease-stabilem Material, während bei dem Experiment mit Cl-C-2 DNA keine vom Background zu unterscheidende Aktivität feststellbar ist. Ebenso ergeben die Versuche mit DNA aus den drei Kontrollzellen eindeutig negative Resultate.

Bei diesen Versuchen trat erstmals eine Korrelation zwischen den Ergebnissen von HAD- und IF-Test einerseits und der Aus-

bildung von Nuclease-resistenten Hybriden anderseits bei den beiden virus-positiven Klonen ein. Da dieser Zusammenhang aber nur bei den Versuchen mit ^{32}P-RNA zu beobachten war und die Aktivitätsverhältnisse bei verschiedenen Hybridisierungen auch etwas differierten, wurde dieser Punkt nicht weiter verfolgt. Ein unspezifischer Effekt auf die Hybridisierungs-Ergebnisse konnte bei Verwendung der Tritium-Markierung nicht festgestellt werden.

Durch die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche ist damit bewiesen, daß die Fusionszell-Klone Cl-E-8 und Cl-F-2 neben den in infizierten Zellen vorkommenden viralen RNAs auch virusspezifische DNA-Sequenzen enthalten. Diese Ergebnisse konnten mit ^{3}H- und ^{32}P-markierter hochspezifischer 6/94 RNA als Nachweisprobe erzielt werden; Kontrollhybridisierungen mit virusfreien Zellen bestätigten durch ihren völlig negativen Ausgang die Spezifität des Nachweissystems. Durch Schmelzprofile konnte die korrekte Basenpaarung der Hybride gezeigt werden.

Die Cl-C-2 Zellen verhalten sich auch in diesem Test auf virusspezifische Komponenten negativ. Man muß deshalb für diese Zell-Linie annehmen, daß sie niemals mit dem 6/94 Virus Kontakt hatte oder aber ihre virusspezifischen Anteile im Anschluß an die Fusionierung verloren hat. Da sie aber aus der gleichen Gewebeprobe stammt wie die beiden anderen Klone und der gleichen Fusionierungs-Prozedur unterzogen wurde , stellt sie andererseits ein hervorragendes Kontrollsystem für die Spezifität der Hybridisierungsexperimente dar. Damit sind alle Einwände, die 6/94 Viren stammten aus dem Fusionspartner CV-1, weitgehend entkräftet.

Zusätzlich zum Nachweis von virusspezifischen DNA Sequenzen wurde noch versucht, eine quantitative Abschätzung über die Anzahl der pro Zelle enthaltenen viralen Genome zu erhalten.

3.4.6. Quantitative Abschätzung der 6/94 spezifischen DNA-Sequenzen pro Zelle

Unter der Annahme, daß in latent infizierten Zellen die gesamte virale Information als DNA vorliegt, wurde eine Abschätzung der durchschnittlich in den Fusionszellen enthaltenen 6/94 Genome durchgeführt. Dazu wurde eine Sättigungs-Hybridisierung eingesetzt, aus deren Ergebnis rechnerisch die Kopienzahl ermittelt werden konnte.
Bei der Sättigungs-Hybridisierung sollen durch Erhöhung der Konzentration eines Reaktionspartners, in diesem Fall der 6/94 ^{3}H-RNA, alle in der Zell-DNA enthaltenen virusspezifischen Sequenzen abgesättigt werden; somit ist eine quantitative Aussage möglich.
Da bei diesem Experiment der Einsatz an 6/94 ^{3}H-RNA sehr groß war, konnte der Versuch aus Materialgründen nur einmal wiederholt werden. Beide Versuche fielen im Rahmen der experimentellen Schwankung identisch aus. Trotzdem ist die in Abbildung 43 gezeigte Kurve nur als Näherung anzusehen.
Der Steigerung der 6/94 ^{3}H-RNA Konzentration folgt eine Erhöhung der Hybridaktivität, die jedoch nach Überschreiten von 20.000 cpm pro Ansatz nachläßt und in einem Plateau ausläuft. Die Ausbeute an Nuclease-resistenten cpm erreicht bei rund 1.400 cpm einen Endstand. Dieser Wert dient als Berechnungsgrundlage für die Abschätzung der pro Zelle vorhandenen viralen DNA-Kopien:
In dem Hybridisierungsansatz sind 100 µg aus Zellen isolierte DNA enthalten. Bei einem MW von $4{,}3 \times 10^{12}$ Dalton für die nucleäre DNA von Zellen der menschlichen Hirnrinde (Heller et al. 1954) entsprechen den 100 µg DNA $1{,}4 \times 10^{7}$ DNA-Moleküle. Wenn nun pro Zelle eine DNA-Kopie des viralen Genoms vorliegt, dann könnte diese mit je einer viralen ^{3}H-RNA quantitativ hybridisieren. Das ergibt bei $1{,}4 \times 10^{7}$ DNA-Molekülen und einem Gewicht des 6/94 Genoms von $1{,}1 \times 10^{-11}$ µg eine RNA-Menge von $1{,}6 \times 10^{-4}$ µg. Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität der hier eingesetzten 6/94 ^{3}H-RNA von 2×10^{5} cpm/µg entsprechen dieser RNA-Menge rund 30 cpm. Vorausgesetzt, daß in jeder

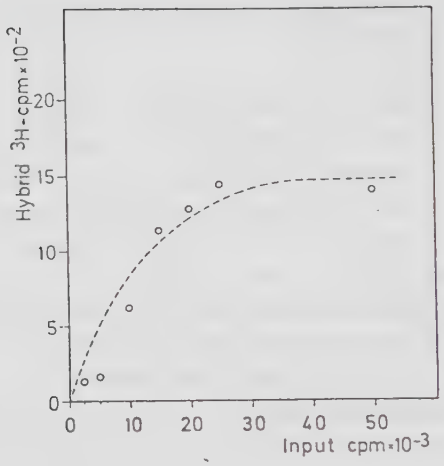


Abb.43 : Steigerung der Hybridausbeute bei der Hybridisierung von 6/94 ^{3}H-RNA und DNA aus Cl-E-8 Zellen durch Erhöhung der RNA-Konzentration.

Je 100 µg gereinigte DNA aus Cl-E-8 Zellen wurde zusammen mit der jeweils angegebenen 6/94 ^{3}H-RNA Menge im Hybridisierungsansatz (2.7.) für 4 Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 600 µl S1-Puffer und 5 U S1-Nuclease / 20 µg/ml RNase A gemischt und 60 min. bei 45 °C inkubiert. Von jeder Probe wurde die säurefällbare Radioaktivität der Nuclease-resistenten Hybride bestimmt und diese Werte gegen die eingesetzte RNA Menge aufgetragen.

Zelle durchschnittlich eine DNA-Kopie des Virus-Genoms enthalten ist, ist folglich mit einer Hybridaktivität von maximal 30 cpm zu rechnen.
Wendet man diese Abschätzung nun auf die Sättigungs-Hybridisierung mit Cl-E-8 DNA und 6/94 ^{3}H-RNA an, so ergibt sich, daß in diesen Zellen mit rund 45 Genomäquivalenten zu rechnen ist. Gleichzeitig sieht man aber auch, daß die Abschätzung mit einigen systematischen Fehlern behaftet sein kann, die den errechneten Wert um etwa 50% nach oben oder unten verschieben können.
Abschließend kann man folgende Aussage machen:
Die mit DNA aus den drei Fusionszell-Linien erhaltenen Hybridisierungsdaten zeigen, daß in den Zellen Cl-E-8 und Cl-F-2

mehrere DNA-Genomäquivalente des 6/94 Virus enthalten sind. Dagegen ist mit diesem Hybridisierungssystem, welches ab ungefähr einem Genom-Äquivalent pro Zelle keine sichere Aussage mehr zuläßt, in den C1-C-2 Zellen virusspezifische DNA nicht nachweisbar.
Obwohl die Spezifität des Nachweissystems durch verschiedene Kontrollen bereits hinreichend gezeigt war, wurden zu diesem Punkt eine Reihe von weiteren Versuchen unternommen. Dabei sollten alle Einwände bezüglich einer zellulären Kontamination der Hybridisierungsprobe durch eine in einem völlig anderen Wirtssystem synthetisierte 6/94 ^{3}H-RNA beseitigt werden.

3.5. Verbesserung der Spezifität des Nachweissystems durch in-vitro synthetisierte 6/94 ^{3}H-cRNA

Um die Spezifität des Hybridisierungssystems noch weiter zu steigern, wurde versucht, die 6/94 ^{3}H-RNA nicht mehr aus den in Fusionszellen gewachsenen Viren zu isolieren. Bei dem bisherigen Nachweisverfahren konnte immer noch der Einwand erhoben werden, die positiven Hybridisierungsergebnisse seien das Produkt einer wenn auch geringen Verunreinigung der 6/94 RNA mit zellulärer RNA. Gegen dieses Argument sprach die Tatsache, daß die Hybridisierung mit der 6/94 RNA in allen Kontrollzellen negative Resultate erbrachte. Jedoch konnte nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, daß eine speziell in den C1-E-8 und C1-F-2 Zellen vorkommende RNA die positiven Hybridisierungsergebnisse bei diesen beiden Zell-Klonen bewirkte.
Deshalb sollte die Virusvermehrung in einem anderen Wirtssystem, z.B. in Hühnerembryonen, erfolgen und die isolierte 6/94 50s RNA dann in einem in-vitro System als Matrize für die Synthese einer radioaktiv markierten RNA-Kopie eingesetzt werden. Damit sollte erreicht werden, daß die Wirtszellen der Viren unmarkiert blieben und erst an der gereinigten viralen 50s RNA eine hochmarkierte cRNA synthetisiert wurde. Außerdem konnte man davon ausgehen, daß bei potentiell im Virus mit-

geschleppten RNA Sequenzen der Hühner-Zellen der Art-Sprung zu den Primaten so groß sei, daß es auch im Bereich der ribosomalen RNA kaum noch Homologien gäbe, die wieder zu einer Verfälschung der Hybridisierungsergebnisse führen könnten.
Einige Schwierigkeiten bereitete zunächst die Auswahl eines geeigneten in-vitro Systems für die cRNA Synthese.

3.5.1. In-vitro Synthese von ^{3}H-cRNA an viraler 6/94 RNA

Die Synthese von complementärer RNA durch das virale Enzym RNA-abhängige RNA Polymerase gestaltet sich bei den Paramyxoviren in-vitro äußerst schwierig. Im Vergleich zu den Viren der Reo- oder Rhabdo-Gruppe ist die RNA Polymerase der Paramyxoviren um den Faktor 50-100 weniger aktiv (Bukrinskaya 1973). Außerdem kann bei der Isolation der Polymerase aus den Viruspartikeln mit Detergenz leicht die gesamte Aktivität verloren gehen (Robinson 1971).
Wegen dieser Schwierigkeiten wurde lange nach einem leichter zu handhabenden in-vitro System für die cRNA Synthese gesucht. Als im Herbst 1977 Bernard et al. ein universell einsetzbares System publizierten und dessen Verwendbarkeit an rRNA und mRNA zeigen konnten, wurde versucht, dieses in-vitro System auch zur Synthese von 6/94 ^{3}H-cRNA heranzuziehen (Bernard et al. 1977).
Wichtigste Komponente dieses Systems ist das Enzym RNA-Polymerase aus E.coli. Dieses Enzym schreibt normalerweise DNA in mRNA um. Durch Wechsel der Ionenbedingungen von Magnesium auf Mangan und relativ hohe Substrat- und Enzym-Konzentrationen kann die RNA-Synthese auch an einer RNA als Matrize erfolgen. Weitere Komponenten des Polymerase-Ansatzes sind verschiedene Salze und die vier Ribotriphosphate. Durch Ersetzen eines Ribotriphosphates durch ein ^{3}H-rNTP kann die Synthese meßbar gemacht werden. In der Abbildung 44 ist die Synthese von ^{3}H-cRNA an 6/94 RNA wiedergegeben.
Es zeigt sich, daß die cRNA Synthese auch an gereinigter 6/94 RNA als Matrize erfolgt. Bei manchen Tests zeigt die Synthese,

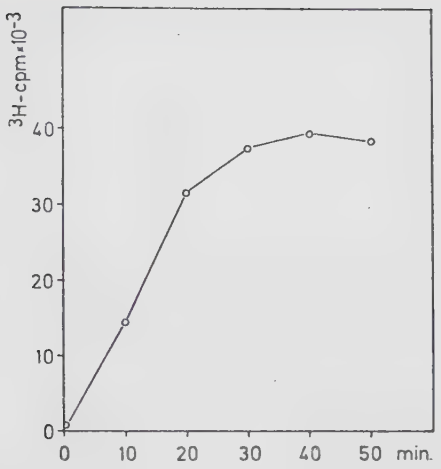


Abb. 44: In-vitro Synthese von ^{3}H-cRNA an 6/94 RNA als Template mit Hilfe von RNA-Polymerase von E. coli.

6/94 Viren, die in embryonierten Hühnereiern gezüchtet worden waren, wurden durch fraktionierte Zentrifugation gereinigt, charakterisiert und die RNA aus ihnen isoliert (siehe 2.2. und 2.3.). In den 100 µl cRNA Synthese Ansatz wurden dann 0,4 µg gereinigte 6/94 50s RNA, 30 mM Tris-HCl pH 7,8, 30 mM KCl, 2,5 mM $MnCl_2$, 0,5 mM DTE, 0,5 mM EDTA, 2,7 µg RNA-Polymerase, je 300 µM rATP, rGTP, rUTP und 5 µCi ^{3}H-rCTP (18 Ci/mMol) eingesetzt. Nach Inkubation bei 37 °C wurde zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min. je ein 15 µl Aliquot entnommen und das säurefällbare ^{3}H-dCMP als Maß für die Synthese bestimmt.

gemessen am eingebauten ^{3}H-rCMP, nach 40-50 min. Inkubation eine Verlangsamung der Reaktion; andere Kinetiken verliefen hingegen über 2 Std. und länger weitgehend linear, wie auch in der Publikation von Bernard et al. beschrieben wird.
Die von den Autoren beschriebene Präinkubation der RNA für 5 min. bei 65°C zur Verminderung der Sekundärstruktur ergab keine verbesserte Synthese und wurde deshalb nicht angewendet.
Aus den Daten des eingesetzten ^{3}H-rCTP läßt sich die spezifische Aktivität der synthetisierten ^{3}H-cRNA wie folgt errechnen: Bei einer angegebenen Aktivität des ^{3}H-rCTP von 25 Ci/mMol ergibt sich unter Berücksichtigung der gegebenen Zählausbeute von rund 500.000 cpm/ 1µCi die Aktivität von 12.500

Mn^{++}-Konzentration	Einbau nach 60 min. (cpm x 10^{-3})	Inkubationstemperatur	Einbau nach 60 min. (cpm x 10^{-3})
2 mM	3,9	32°C	1,4
5 mM	18,7	35°C	4,2
8 mM	28,8	37°C	12,7
12 mM	30,1	40°C	5,9
15 mM	14,6	42°C	3,1

Tab. 6: Abhängigkeit der in-vitro ^{3}H-cRNA Synthese von der Mn^{++}-Konzentration im Ansatz bzw. von der Inkubationstemperatur.

Bei 100 µl Standardansätzen (Zusammensetzung siehe Legende zu voriger Abbildung)mit 2,7 µg RNA Polymerase und 0,4 µg gereinigter Cl-E-8 RNA wurde die Mn^{++}-Konzentration auf 2, 5, 8, 10, 12 und 15 mM eingestellt bzw. die Inkubationstemperatur auf 32, 35, 37, 40 und 42 °C gehalten. Nach 0, 30, 60, 90 und 120 min. wurde je ein 20 µl Aliquot entnommen und durch TCA-Fällung (2.5.2.) die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt. Angegeben ist die Aktivität des eingebauten ^{3}H-CMP bei den jeweiligen Mangan-Konzentrationen bzw. Inkubationstemperaturen nach 60 min. Inkubationsdauer.

cpm in einem picoMol ^{3}H-rCTP. Die Synthese an der heteropolymeren 6/94 RNA erfordert alle 4 RNA Vorstufen. Folglich muß für die Umrechnung ein aus allen vier Nucleotiden gemitteltes Molekulargewicht von 321,46 (nach Abzug des durch die Diester-Bindung abgespaltenen Wassers) eingesetzt werden. 12.500 cpm entsprechen somit 0,32146 ng ^{3}H-rNMP. Daraus kann man die Aktivität von 1 µg ^{3}H-cRNA berechnen, wobei noch zu beachten ist, daß nur eine der vier Basen markiert ist. Es ergibt sich für die 6/94 ^{3}H-cRNA eine spezifische Aktivität von $9,7 \times 10^6$ cpm/ 1 µg RNA.

3.5.2. Optimierung der ^{3}H-cRNA Synthese an 6/94 RNA

Nachdem durch die im vorigen Abschnitt beschriebenen Vorversuche geklärt war, daß die cRNA Synthese auch an 6/94 RNA abläuft, wurden nun die einzelnen Reaktionsparameter überprüft. Die Mangan-Konzentration und Inkubationstemperatur wurden nachoptimiert und der Einfluß von Enzym-Menge und RNA-Template Konzentration untersucht. In Hinblick auf die limitierte 6/94 50s RNA wurden diese Optimierungen mit gereinigter Cl-E-8 RNA

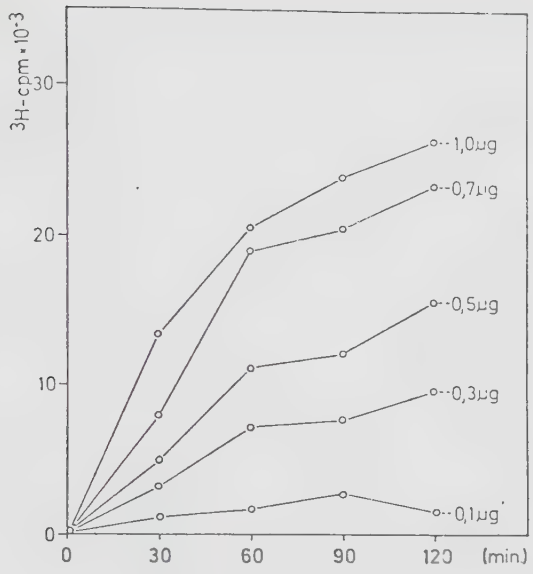


Abb. 45: Einfluß der RNA-Konzentration auf die in-vitro Synthese von 3H-cRNA.

In Standardansätze (2.6.1.) mit 0,27 mg/ml RNA Polymerase und 2,5 mM $MnCl_2$ wurden 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 und 1,0 µg gereinigte RNA aus Cl-E-8 Zellen eingesetzt und die Ansätze bei 37 °C inkubiert. 20 µl Aliquots wurden nach 0, 30, 60, 90 und 120 min. entnommen und die in ihnen enthaltene säurefällbare Radioaktivität bestimmt. Diese wurde abhängig von der Inkubationszeit aufgetragen und die Meßpunkte einer jeden RNA-Konzentration verbunden.

durchgeführt. Die Ergebnisse der Optimierungen von Temperatur und Mangan-Konzentration sind in der Tabelle 6 wiedergegeben.

Bei einer Mangan-Konzentration von 10 mM ergibt sich die höchste Einbaurate an ^{3}H-rCMP. Auch bei den verschiedenen Inkubationstemperaturen ergibt sich ein scharfes Optimum bei 37°C; 2-3°C mehr oder weniger lassen die Synthese bereits auf rund 40% absinken. Während das Temperaturoptimum gut mit den publizierten Daten übereinstimmt, gibt es bei dem Mangan-Optimum eine starke Verschiebung von 2,5 mM auf 10 mM, verbunden mit einer Steigerung der Syntheseleistung um fast das 10-fache. Als nächstes wurde die Abhängigkeit der ^{3}H-cRNA Synthese von

der eingesetzten Enzym-Konzentration bestimmt. Auch durch diese Optimierung sollte eine möglichst günstige Ausnutzung der RNA-Matrize erreicht werden. Bei diesem Versuch zeigte sich eine zunächst fast lineare Steigerung der Einbaurate bei steigenden Enzym-Mengen; ab ungefähr 0,3 mg Enzym/ml setzte dann eine Sättigung des in-vitro Systems mit Polymerase ein.

Im folgenden Versuch wurde der Einfluß der RNA-Konzentration auf die Synthese von ^{3}H-cRNA untersucht.Damit sollte gezeigt werden, daß die Polymerase-Reaktion in Abhängigkeit von der RNA-Matrize abläuft. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 45 zusammengefaßt.
Zwischen eingesetzter RNA-Menge und Einbau von ^{3}H-rCMP als Maß für die cRNA Synthese ergibt sich ein klarer Zusammenhang. Eine Konzentration von 1 µg/ml bringt die ^{3}H-cRNA Synthese fast zum Erliegen, während bei 10 µg/ml sich umgekehrt bereits eine Erschöpfung des in-vitro Systems bemerkbar macht. Dadurch ist gezeigt, daß die cRNA Synthese in Abhängigkeit von der RNA-Matrize abläuft.
Aufgrund der verschiedenen Optimierungen war die Syntheseleistung im Verhältnis zu den Vorversuchen um den Faktor 10 gesteigert worden. Durch ein vergleichendes Experiment wurde abschließend noch gezeigt, daß die cRNA Synthese unter den für Cl-E-8 RNA optimierten Bedingungen auch bei 6/94 RNA als Matrize zu einer Einbausteigerung führt. Die Synthese lag dabei um den Faktor 2 höher als bei Cl-E-8 RNA. Somit waren alle Voraussetzungen für eine präparative Synthese von 6/94 ^{3}H-cRNA geschaffen.

3.5.3. Präparative Synthese, Reinigung und Charakterisierung von 6/94 ^{3}H-cRNA

Die präparative Synthese von 6/94 ^{3}H-cRNA wurde in 3-fach Ansätzen durchgeführt. Die Zusammensetzung dieser 300 µl Ansätze entsprach den Ergebnissen der verschiedenen Optimierungen und ist in 2.6.1. wiedergegeben. Wegen teilweise abknickender Kinetiken wurde die Inkubationszeit auf 40 min. begrenzt. Bei

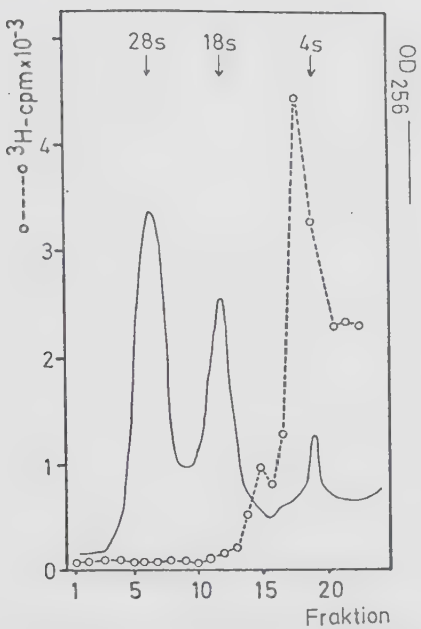


Abb. 46: Sedimentationsanalyse der in-vitro synthetisierten 6/94 ^{3}H-cRNA im neutralen Sucrosegradienten.

2 500 cpm gereinigte, hitze-denaturierte 6/94 ^{3}H-cRNA wurde mit 100 µg gesamt-RNA aus Vero-Zellen gemischt und auf einen kontinuierlichen Zuckergradienten aus 5-20 % Sucrose in STE mit 0,1 % SDS überschichtet. Die Sedimentation erfolgte für 2,5 Std. im SW 60 Rotor der Beckman-Ultrazentrifuge bei 45 000 rpm und 17 °C. Nach Beendigung des Laufes wurde der Gradient von unten angestochen, durch ein Durchflußphotometer gepumpt und in 21 Fraktionen geteilt. Von jeder Fraktion wurde die säurefällbare Radioaktivität bestimmt. Diese wurde in die vom Durchflußphotometer im UV-Bereich bei 256 nm aufgezeichnete Kurve eingetragen.
UV-Messung bei 256 nm (——), säurefällbare Aktivität (--o--o--).

Einsatz von 5 µg gereinigter 6/94 RNA wurde ein Einbau von 924.000 cpm ^{3}H-dCMP erzielt. Der gesamte Syntheseansatz wurde dann durch zweimalige SDS/Phenol-Behandlung von Enzymproteinen gereinigt und mit Alkohol gefällt. Die gereinigte 6/94 ^{3}H-cRNA wurde in Aliquots von 25.000 cpm bei -20°C eingefroren aufbewahrt.

Eine erste Charakterisierung der 6/94 ^{3}H-cRNA erfolgte durch

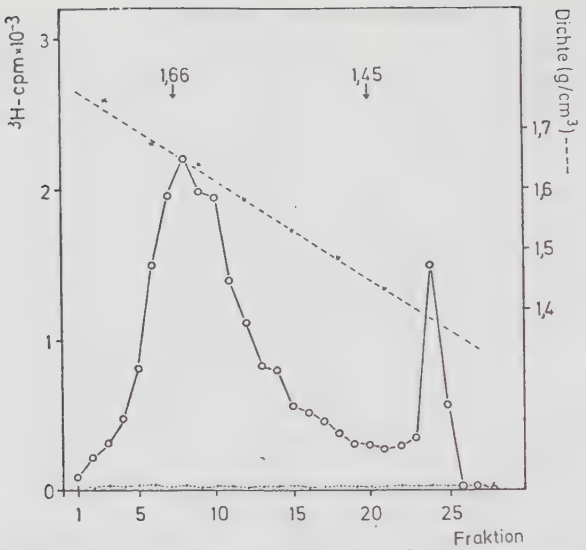


Abb. 47: Ermittlung der Schwimmdichte der 6/94 ^{3}H-cRNA im Cs_2SO_4-Dichtegradienten und Überprüfung der Nuclease-Sensibilität.

Je 25 000 cpm in-vitro synthetisierte 6/94 ^{3}H-cRNA wurden 5 min. bei 100 °C gehalten und dann schnell im Eisbad abgekühlt. Dann wurde eine Probe mit STE auf 100 µl verdünnt und mit 20 µg/ml RNase A 60 min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden beide Proben mit 100 µg t-RNA gemischt und im Cs_2SO_4-Dichtegradienten (2.8.1.) für 66 Std. im Rotor Ti 50 bei 40 000 rpm, 15 °C zentrifugiert. Nach Beendigung des Laufes wurden die Gradienten von unten angestochen und fraktioniert. Die säurefällbare Radioaktivität wurde von jeder Fraktion ermittelt (2.5.2.) und gegen die aus den Refraktionswerten errechnete Dichtegerade aufgetragen (2.8.1.). 6/94 ^{3}H-cRNA ohne Nuclease-Verdau (--o--o--), 6/94 ^{3}H-cRNA nach RNase Verdau (--x--x--).

Sedimentation in einem kontinuierlichen Sucrosegradienten von 5-20%. Als Positionsmarker wurde ribosomale RNA aus unmarkierten Vero-Zellen im gleichen Gradienten mitzentrifugiert. Abbildung 46 zeigt das Profil dieses Versuches.
Der Sedimentationsgradient der 6/94 ^{3}H-cRNA zeigt ein Maximum im Bereich von 5s. Unterhalb dieses s-Wertes nimmt die Aktivität stark ab. Rund 30% der gesamt-Aktivität sind jedoch in Bereichen mit s-Werten bis zu 14s zu finden. Diese Ergebnisse stimmen hinsichtlich der Produktlänge gut mit der von Bernard

et al. an globin-mRNA und ribosomaler 28s RNA synthetisierten cRNA überein.
In weiteren Versuchen wurde die Schwimmdichte der synthetisierten 6/94 cRNA überprüft. Diese liegt im Cs_2SO_4-Dichtegradienten bei 1,66 g/cm^3. Neben dem Hauptpeak im RNA-Bereich gibt es noch geringe Aktivität im Dichte-Bereich zwischen 1,37-1,39 g/cm^3. Dieser Nebenpeak dürfte durch RNA verursacht werden, die nicht vollständig von Proteinen befreit ist.

Durch ein Parallelexperiment wurde die Nuclease-Sensitivität der 6/94 ^{3}H-cRNA untersucht. Für die nachfolgend beschriebenen Hybridisierungs-Versuche ist eine möglichst vollständige Nuclease-Sensitivität der cRNA entscheidende Voraussetzung. Nach RNase-Verdau blieb von der ^{3}H-cRNA im Dichtegradienten nur ein über alle Fraktionen gleichmäßig verteilter Background von 20-40 cpm übrig. Die Ergebnisse dieser beiden Dichtegradienten-Analysen sind zusammen in Abbildung 47 wiedergegeben.

Durch diese Untersuchungen war die 6/94 ^{3}H-cRNA für die nun folgenden Hybridisierungsexperimente ausreichend charakterisiert. Der gemessene s-Wert zwischen 4 und 18s ergab eine Moleküllänge, die eine spezifische Hybridisierung gewährleistet. Die Dichtegradientenanalyse von Schwimmdichte und Nuclease-resistentem Material ergab die für die Charakterisierung von Hybriden erforderlichen Eigenschaften der cRNA.

3.5.4. Nachweis von 6/94 DNA-Sequenzen in den Fusionszell-Linien durch Hybridisierung mit 6/94 ^{3}H-cRNA

Die Hybridisierungsexperimente zum Nachweis von virusspezifischen DNA-Sequenzen in den drei Fusionszell-Linien wurden nun mit Hilfe der in-vitro synthetisierten ^{3}H-cRNA nochmals wiederholt. Die 6/94 RNA, die als Matrize bei der Synthese der cRNA diente, stammte aus Viren, die in embryonierten Hühnereiern gezüchtet worden waren; dadurch sollte der Einwand entkräftet werden, die positiven Resultate bei den Hybridisierungen mit in-vivo markierter 6/94 RNA seien auf eine Kontamination mit

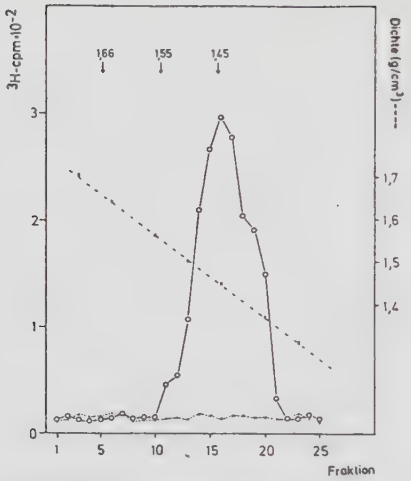


Abb. 48 : Analyse der Hybridisierungsprodukte von DNA aus Cl-E-8 Zellen und 6/94 ^{3}H-cRNA nach Nuclease-Verdau im Cs_2SO_4-Gradienten. Hybridisierungen mit Cl-E-8 DNA (--o--o--), mit Vero-DNA (--x--x-)

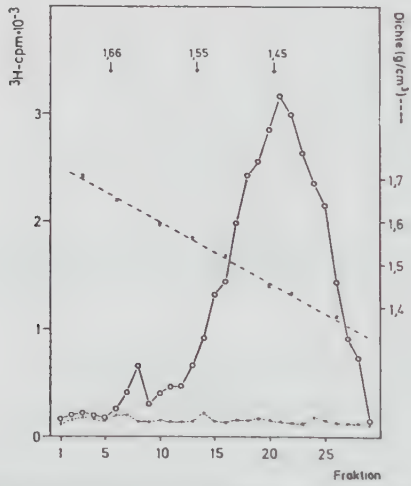


Abb. 49 : Dichtegradientenanalyse der Nuclease-resistenten Hybridisierungsprodukte aus Cl-F-2 DNA und 6/94 ^{3}H-cRNA.
Hybridisierung mit Cl-F-2 DNA (--o--o--), mit DNA aus Vero Zellen (--x--x--).

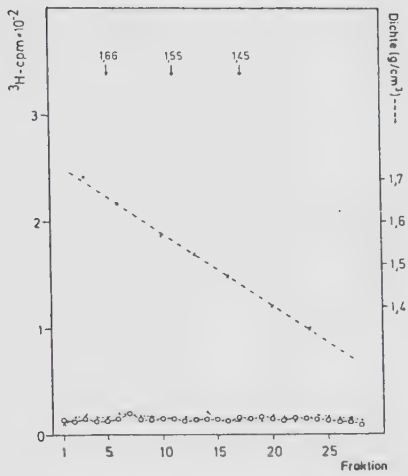


Abb. 50: Hybridisierung von DNA aus Cl-C-2 Zellen mit in-vitro synthetisierter 6/94 ^{3}H-cRNA; Analyse der Produkte nach Nuclease Verdau im Dichtegradienten.
(-o--o--) Cl-C-2, (--x--x-) Kontrollhybridisierung mit DNA aus Vero Zellen.

Je 25 000 cpm gereinigte 6/94 ^{3}H-cRNA wurden mit 100 µg gereinigter DNA aus den drei Fusionszell-Linien Cl-E-8, Cl-F-2, Cl-C-2 sowie aus den Kontroll-Zellen (HeLa-Zellen, Vero-Zellen und primäre, embryonale Hühnerfibroblasten) gemischt, für 10 min. bei 100 °C im Wasserbad gehalten und dann schnell im Eisbad abgekühlt. Anschließend wurden die Nucleinsäuren mit 0,4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM EDTA und 60% Formamid in 50 µl Ansätzen bei 37 °C für 60 Std. im Wasserbad inkubiert. Dann wurden die gesamten Ansätze mit 600 µl S1-Puffer, 5 U S1-Nuclease und 20 µg/ml RNase A gemischt und für 60 min. bei 45 °C inkubiert. Die Dichtegradientenanalyse der nucleaseresistenten Hybride erfolgte bei 40 000 rpm und 15 °C im Rotor Ti 50 der Beckman Ultrazentrifuge für 66 Std. (2.8.1.). Nach Beendigung des Laufes wurden die Gradienten von unten angestochen und in ungefähr 30 Fraktionen aufgeteilt. Von jeder Fraktion wurde die säurefällbare Radioaktivität ermittelt (2.5.2.). Durch Refraktionsmessung in jeder dritten Fraktion konnte nach Umrechnung eine Dichtegerade erstellt werden. Angegeben sind die Ergebnisse der Hybridisierungen mit DNA aus den drei Fusionszell-Linien (-o--o--) sowie als Kontrollexperiment die Hybridisierung mit DNA aus Vero-Zellen (--x--x-).

mitgeschleppter zellulärer ^{3}H-RNA zurückzuführen. Gleichzeitig sollten auch die bisherigen Ergebnisse der Hybridisierungen von Fusionszell-DNA mit in-vivo markierter 6/94 RNA nochmals

durch ein anderes Nachweissystem bestätigt werden.
DNA aus jeder der drei Fusionszell-Linien wurde zusammen mit 6/94 ^{3}H-cRNA im Hybridisierungsansatz inkubiert. Zum Abtrennen der ungebundenen ^{3}H-cRNA und zum Entfernen nicht vollständig gepaarter Sequenzen wurde der gesamte Hybridisierungsansatz anschließend einem enzymatischen Verdau mit RNase A und Nuclease S1 unterzogen. Dann erfolgte die Bestimmung der Schwimmdichte der Nuclease-resistenten Hybride im Cs_2SO_4-Dichtegradienten. Als Kontrollen wurden in Parallelexperimenten Hybridisierungen mit DNA aus 6/94 freien Zellen durchgeführt. Hierzu wurden wiederum menschliche HeLa-Zellen, Affennierenzellen (Vero-Zellen) und primäre embryonale Hühnerfibroblasten verwendet. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in den drei Abbildungen 48 bis 50 dargestellt.

Die Hybridisierungen mit in-vitro synthetisierter 6/94 ^{3}H-cRNA als Nachweisprobe bestätigen die Ergebnisse der entsprechenden Versuche mit in-vivo markierter 6/94 RNA. Bei den Experimenten mit DNA aus Cl-E-8 und Cl-F-2 Zellen ist eine Nuclease-resistente Hybridaktivität im Dichtebereich zwischen 1,45-1,55 g/cm^{3} feststellbar. Der RNA-Bereich hingegen, in dem ungebundene cRNA bandieren würde, ist frei von Aktivität.
Auch das Ergebnis der Hybridisierung von Cl-C-2 DNA mit 6/94 ^{3}H-cRNA entspricht den vorangegangenen Versuchen mit in-vivo markierter RNA: Nach Nuclease Verdau zeigt sich im Gradienten keine Hybridaktivität. Der verbleibende Background liegt gleichmäßig um 20 cpm pro Fraktion.
Die Hybridisierungen mit DNA aus den drei Kontrollzell-Linien zeigen ebenfalls nur Background-Aktivität um 20 cpm und geben damit keinen Hinweis auf eine Kontamination der in-vivo markierten 6/94 RNA.
Somit lassen sich die erhaltenen Ergebnisse zusammenfassen: Bei der Hybridisierung von DNA aus den drei Fusionszell-Linien mit in-vitro synthetisierter 6/94 ^{3}H-cRNA ergeben sich die gleichen Resultate wie bei den vorher durchgeführten Versuchen mit in-vivo markierter RNA: In den Zell-Linien Cl-E-8 und Cl-F-2, die virale 6/94 RNA enthalten, ist virusspezifische DNA nachweisbar. Bei der Fusionszell-Linie Cl-C-2 ist dies

nicht der Fall. Kontrollhybridisierungen mit DNA aus drei 6/94-freien Zell-Linien bestätigen die Spezifität der Hybridisierung. Durch Verwendung von RNA aus in Hühnereiern gezüchteten 6/94 Viren als Matrize für die in-vitro cRNA-Synthese kann eine Verfälschung der Hybridisierungsergebnisse durch mitgeschleppte zelluläre RNA ausgeschlossen werden. In diesem Fall wäre ein positives Resultat der Hybridisierung mit Hühnerfibroblasten-DNA zu erwarten gewesen, nicht jedoch mit DNA aus den Fusionszellen.
Damit ist die Spezifität der verwendeten Hybridisierungssysteme ein zweites Mal nachgewiesen.

4. DISKUSSION

Mehrere Gehirnzellklone einer an Multipler Sklerose verstorbenen Patientin, in denen durch Fusionierung mit Affennierenzellen in Gegenwart von Lysolecithin das latente 6/94 Virus aktiviert worden war, wurden durch Hybridisierungsexperimente auf virusspezifische Nucleinsäuren untersucht. Die drei Zellklone, die alle aus der gleichen Gewebeprobe stammten, hatten in virusspezifischen Tests unterschiedliche Resultate gezeigt. In den Hybridisierungsexperimenten konnte durch hochspezifische Nachweisproben gezeigt werden, daß die viruspositiven Zellklone virale RNA und virusspezifische DNA enthalten. Im virusnegativen Klon Cl-C-2 und in Kontrollzellen konnten keinerlei 6/94 spezifische Sequenzen gefunden werden.
Das 6/94 Virus ist als Vertreter der Paramyxogruppe ein RNA-Virus. Diese Viren replizieren ihre Erbinformation nur auf dem RNA-Niveau. Deshalb wurden die drei Zell-Klone zunächst auf virusspezifische RNA-Sequenzen untersucht.
Die dazu angewandte Hybridisierungstechnik mit einer virusspezifischen cDNA war bei den Retroviren entliehen und im Rahmen einer früheren Arbeit war bereits die dazu erforderliche cDNA Synthese auch an 6/94 RNA durchgeführt worden (Neubert 1976). Da aber inzwischen die Charakterisierungsmethoden für Nucleinsäurehybride durch den Einsatz von Nucleasen erweitert und verbessert worden waren, mußte die 6/94 cDNA-Synthese nochmals optimiert werden. Das Ziel dabei war, den Anteil an Nuclease-S1 resistenter 6/94 cDNA möglichst weit zu senken. Durch Zusatz von 200 µg/ml Act.D konnte die Nuclease-S1 Sensitivität der 6/94 cDNA auf 97,4% gesteigert werden.
Bevor die an 6/94 RNA synthetisierte cDNA zum Nachweis von viraler RNA in den Fusionszellen eingesetzt werden konnte, mußte noch ihre Spezifität eingehend geprüft werden. Dies geschah durch Rückhybrisisierungsexperimente mit viraler 6/94 RNA. Dabei zeigte sich eine Verschiebung des Aktivitätsmaximums im Cs_2SO_4 Dichtegradienten vom DNA Dichte-Bereich zur RNA-Dichte: Die cDNA Stücke hatten mit der langen 6/94 50s RNA reagiert. Durch Nuclease-S1 Verdau vor der Dichtegradien-

tenanalyse konnten die Rückhybride weiter charakterisiert werden: Es ergab sich eine erneute Verschiebung der Aktivität im Gradienten, diesmal in den Hybridbereich bei 1,55 g/cm^3. Damit war die Spezifität der 6/94 cDNA schon weitgehend nachgewiesen. Trotzdem wurde die korrekte Basenpaarung des Rückhybrids durch Aufstellen einer Schmelzkurve noch nachgewiesen: Es ergab sich ein Schmelzpunkt von 90^{0}C. Damit war die Spezifität der 6/94 ^{3}H-cDNA nachgewiesen und es konnte begonnen werden, die drei Fusionszell-Linien mit Hilfe dieser cDNA auf virale RNA zu untersuchen.

An Hand der drei Fusionszell-Linien sollte nun die Frage nach einer Beteiligung von viraler Genom-RNA an der viralen Persistenz untersucht werden. Alle drei Zell-Linien entstammten einer Fusionierung von Gewebe aus einem Plaque-angrenzenden Bereich im Gehirn einer M.S. Patientin mit CV-1 Zellen. Trotzdem zeigten die Klone in virusspezifischen Tests stark unterschiedliche Werte. Erst nach der Fusionierung ergaben die Tests positive Resultate, während schon vorher Nucleocapsidähnliche Strukturen in den Gehirnzellen zu erkennen waren. Da auch andere Autoren glaubten, diese Strukturen gesehen zu haben, lag es durchaus im Bereich des Möglichen, daß die Persistenz von RNA-Viren durch Lagerung der Genom-RNA im Zytoplasma in Form von Nuclease-resistenten Nucleocapsiden erfolgen könnte. Um diesen Zusammenhang abzuklären, schienen die drei Fusionszell-Linien ein geeignetes Modellsystem zu sein. Der viruspositive Klon Cl-E-8 konnte als Kontrolle für das Nachweissystem dienen. Der Klon Cl-F-2 mit weniger virusproduzierenden Zellen sollte eine eventuell geringere positive Reaktion ergeben. Für Cl-C-2 war der Ausgang des Experiments ungewiß: Im günstigeren Fall enthält dieser Zell-Klon, der keine Virusproduktion zeigte, auch virale RNA, die jedoch im Gegensatz zu den beiden anderen Zell-Linien nicht aktiviert wurde. Dadurch wäre dann ein Hinweis auf Beteiligung von viraler RNA bei der viralen Persistenz gegeben. Anderseits konnten die Zellen auch virusfrei sein.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde nun RNA aus den Zellen isoliert und mit der 6/94 spezifischen cDNA hybridisiert. Da

die Replikation von Paramyxoviren im Zytoplasma stattfindet und auch die 6/94 Nucleocapside in den späteren Passagen nach der Fusionierung nur im Zellplasma gefunden werden (Iwasaki et al. 1973), wurden die meisten Experimente mit zytoplasmatischer RNA durchgeführt. Spätere Parallelversuche mit zellulärer gesamt-RNA ergaben keine anderen Resultate. Die Experimente zeigten eine klare Hybridisierung für die virusproduzierenden Zell-Linien, während der Klon Cl-C-2 ein negatives Resultat ergab, das allerdings durch die Schulter des cDNA Peaks im Dichtegradienten etwas undeutlich war. Der nachfolgende Nuclease-S1 Verdau der Hybride sowie die aufgestellten Schmelzprofile machten die Resultate eindeutig: In den Zell-Klonen Cl-E-8 und Cl-F-2 waren virusspezifische RNA-Sequenzen nachweisbar, die Schmelzpunkte dieser Hybride lagen um 90°C und waren mit dem des Rückhybrids identisch. Eine Korrelation zwischen dem Prozentsatz virusproduzierender Zellen und der erhaltenen Hybridaktivität konnte nicht aufgestellt werden; das ist nicht verwunderlich, da der Gehalt an viraler RNA in infizierten Zellen stark vom Stoffwechsel-Zustand abhängt. Ein Unterschied bei den Hybridisierungen mit den zwei Zell-Klonen ergab sich durch das Auftreten eines reproduzierbaren Hybrid-Peaks im Dichtebereich 1,55 g/cm^3 bei Cl-E-8 vor dem Nuclease Verdau. Die darin enthaltenen 1:1 Hybride aus virusspezifischer RNA und 6/94 cDNA deuten auf eine kurze Virus-RNA Species hin. Diese könnte durch defektive Viren bedingt sein, deren Auftreten bei Sendai Viren beschrieben wurde (Kingsbury et al. 1970); auch bei 6/94 Viren sind kürzere RNA-Species nachgewiesen worden (Lewandowski et al. 1976), die mit der gefundenen Hybrid-Aktivität bei den Cl-E-8 Zellen in Zusammenhang stehen könnten.

Die bei der Hybridisierung von 6/94 cDNA mit RNA aus Cl-C-2 Zellen gefundene schwache Aktivität im Hybrid-Bereich wurde durch S1-Nuclease Verdau der Proben vollständig eliminiert. Es hatte sich dabei also nicht um eine aus dem cDNA Bereich herausdiffundierte Aktivität gehandelt. In diesen Zellen konnte also mit Hilfe der in-vitro synthetisierten cDNA keine virusspezifische RNA nachgewiesen werden. Für dieses Ergebnis

gibt es prinzipiell zwei Erklärungen: Die Nachweis-Fähigkeiten des Systems reichen nicht aus, um die wenige in diesen Zellen vorhandene virusspezifische RNA aufzuspüren, oder: Die Cl-C-2 Zellen enthalten keine 6/94 spezifische RNA. Zur Nachweisgrenze des Hybridisierungssystems wurden noch einige quantitative Untersuchungen durchgeführt: Im homologen System Tumorvirus-RNA - Reverse Transcriptase werden heute teilweise cDNA Moleküle bis zu einer Länge von 9,5 Kilobasen synthetisiert (Verma et al. 1978); im Gegensatz hierzu können an der 6/94 RNA, die weder natürlichen Primer noch poly-A-Ende enthält, nur cDNA Moleküle mit einer Länge bis zu 2,5 Kilobasen synthetisiert werden. Dies entspricht rund 1/10 des Virusgenoms. Durch indirekte Nachweise konnte außerdem wahrscheinlich gemacht werden, daß die cDNA Synthese an 6/94 RNA nur am viralen Strang und nur von einer Stelle aus beginnt. Dadurch ergibt sich eine Begrenzung der Nachweismöglichkeit auf einen relativ kleinen Teil des viralen Genoms. Gleichzeitig damit sinkt auch die Nachweisgrenze der signifikant meßbaren radioaktiv markierten Hybride. Aus Berechnungen und Experimenten ergab sich hierzu, daß es mit dem verwendeten Hybridisierungssystem möglich sein sollte, noch ein virales Genom pro Zelle signifikant nachzuweisen. Für den Nachweis von virusspezifischen RNA Sequenzen in Cl-C-2 Zellen bedeutet dies: Cl-C-2 Zellen enthalten entweder keine 6/94 RNA, oder falls doch, dann weniger als durchschnittlich ein Genom pro Zelle; oder sie enthalten virusspezifische RNA mit einer Polarität oder Sequenz, die mittels der cDNA nicht nachzuweisen ist. Wenn man die erste Alternative näher betrachtet, so scheint es wenig wahrscheinlich, daß die Stammzelle des Klones Cl-C-2 bereits "virusfrei" war. Während der Passagen nach Fusionierung wäre sie sicher von ihren Nachbarzellen infiziert worden (Cl-C-2 Zellen sind voll reinfizierbar). Wenn aber trotz allem keine virusspezifische RNA nachweisbar ist, muß man annehmen, daß diese bei der Klonierungsprozedur verloren gegangen ist. Die zweite grundlegende Einschränkung des Nachweissystems, daß nämlich nur ein Teil der viralen Information auf der cDNA repräsentiert ist, kann nicht ohne weiteres

aufgehoben werden. Wenn man das gesamte 6/94 Genom in cDNA umwandeln will, so ist das nach dem heutigen Erkenntnisstand nur dadurch zu bewerkstelligen, daß man die Virus-RNA segmentiert und an jedes Stück eine Primerstelle anfügt. Damit sollte es möglich sein, cDNA von der gesamten viralen Nucleinsäuresequenz zu erhalten und damit auch Virus-RNA Stücke aufzuspüren, die bei den bisherigen Versuchen unerkannt blieben. In dieser Richtung sind bereits Vorversuche durchgeführt worden; dabei hat sich gezeigt, daß noch einige technische Schwierigkeiten zu überwinden sind, bevor eine für das gesamte 6/94 Virus-Genom repräsentative cDNA zur Verfügung steht.

Die dritte Alternative, nämlich virusspezifische RNA in Zellen wegen der falschen Polarität nicht zu erkennen, wurde mit einer anderen Methode zusätzlich überprüft. Da sich bei Experimenten im Bereich der RNA-Tumor-Viren gezeigt hatte, daß bei Synthese einer ccDNA diese nur rund 1/10 der Kettenlänge der cDNA erreicht (Verma et al. 1978, Collet et al. 1975), war die ccDNA als Nachweisprobe ungeeignet.
Deshalb wurde versucht, den Nachweis von viraler + und -Strang RNA auf direktem Wege zu führen. Zellen aller drei Klone wurden unter Zusatz von Act.D inkubiert und die dabei synthetisierte, radioaktiv markierte RNA im Sucrosegradienten analysiert. Erwartungsgemäß war in den Cl-E-8 und Cl-F-2 Zellen virale 50s und 18-24s RNA nachweisbar, während im Gradienten mit RNA aus Cl-C-2 Zellen in den entsprechenden Positionen nur Background Aktivität zu messen war. Auch virusspezifische mRNA war in diesen Zellen nicht nachweisbar. Dagegen konnte die aus den virusproduzierenden Zellen isolierte 6/94 spezifische RNA in poly-A-haltige und poly-A-freie RNA aufgetrennt werden. Diese Ergebnisse zeigten nun, daß anscheinend überhaupt keine 6/94 spezifische RNA in den Cl-C-2 Zellen enthalten ist. Ob dieser Zustand bereits in der entsprechenden Gehirnzelle bestand, oder die RNA später verloren ging, war für die gegebene Fragestellung von untergeordneter Bedeutung. Jedenfalls ist eine Beteiligung von virusspezifischer RNA bei der viralen Persistenz in diesem Modellsystem nicht zu zeigen.

Als weitere Möglichkeit für einen Mechanismus der viralen Persistenz auf Nucleinsäure-Ebene wurde die Existenz von virusspezifischen DNA-Sequenzen in den Fusionszellen untersucht. Die Arbeitsgruppen von Zhdanov und Simpson hatten bereits in chronisch infizierten Zellkulturen Paramyxovirus-spezifische DNA Sequenzen nachweisen können (Zhdanov et al. 1974a, Simpson et al. 1975). Im Gegensatz zu diesen experimentell erzeugten latenten Infektionen sollte nun an einem "natürlichen Virus-Zell-System" die Existenz von virusspezifischer DNA eines RNA-Virus untersucht werden.
Als Methodik wurde wieder die vom RNA-Nachweis her erprobte Nucleinsäurehybridisierung eingesetzt. Jedoch wurde nun als spezifischer Nachweis für 6/94 DNA Sequenzen nicht die 6/94 cDNA verwendet, sondern eine hochgereinigte und mehrfach charakterisierte, radioaktiv markierte 6/94 5Os RNA. Die Reinigung dieser RNA erfolgte unter großem präparativen Aufwand. Damit sollten Fehlergebnisse durch Kontamination mit zellulärer RNA weitgehend ausgeschlossen werden. Über ein Mitschleppen von fremder RNA in Paramyxoviren ist bis heute nichts bekannt und eine Reaktion des viralen Nucleoproteins mit einer Fremd-RNA zum Schutz vor Nucleasen wäre nur schwer vorstellbar. Andererseits ist von Vesikuläre Stomatitis Viren, Avian Myeloblastosis Viren und Influenza-Viren her bekannt, daß diese im Inneren des Viruspartikels zelluläre DNA Sequenzen transferieren können (Kingsbury et al. 1974, Deeney et al. 1976, Kantorovich-Prokudina et al. 1978). Zur Vermeidung aller späteren Schwierigkeiten wurde deshalb auf eine genaue und kritische Reinigung der Viren und ihrer RNA Wert gelegt.

Die Virusreinigung erfolgte aus Zellüberständen der Fusionszell-Linien Cl-E-8 und Cl-F-2; durch niedertourige Zentrifugation wurden Zelltrümmer und andere schnellsedimentierende Verunreinigungen entfernt. Dann wurden die Viren alternativ auf verschiedene Weise konzentriert und zwar durch Pelletieren, Sedimentation auf ein Sucrose-Kissen oder durch Ultrafiltration. Das Viruskonzentrat, welches noch große Mengen nicht-viraler Proteine enthielt, wurde durch einen Stufen-

gradient weiter gereinigt. Diesem Schritt schloß sich eine Dichtezentrifugation im Zuckergradienten an, durch die Strukturen mit abweichender Dichte (z.B. Viren der Retro-Gruppe) abgetrennt werden sollten. Das aus dem Gradienten entnommene Virusmaterial wurde dann pelletiert; durch serologische und elektronenoptische Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß es sich hierbei um eine sehr reine Viruspräparation aus gleichförmigen Viren mit Parainfluenza 1 Antigenität handelte. Die virale RNA wurde zunächst durch Aufnehmen eines UV-Spektrums auf ihre Reinheit überprüft und in Verbindung damit die spezifische Aktivität bestimmt. Mit $1\text{-}5 \times 10^5$ cpm/µg RNA lag diese im Bereich der Literaturwerte (Zhdanov et al. 1975). Durch anschließende Geschwindigkeitszentrifugation im kontinuierlichen Sucrosegradienten wurde dann die virale 50s RNA abgetrennt und nur diese in die nachfolgenden Experimente eingesetzt. Durch diesen Schritt sollten eventuell im Innern der Viren befindliche zelluläre RNA-Species eliminiert werden. Da in der Zelle die RNA hauptsächlich aus ribosomaler RNA und kurzen mRNAs besteht, wurden durch diesen Gradienten eventuell vorhandene Kontaminationen mit zellulärer RNA vollständig entfernt. Allerdings waren gerade an dieser Stelle der Reinigungsprozedur die Verluste sehr hoch. Die nun erhaltene 'reine 6/94 ^{3}H-RNA' mußte noch einer Reihe von Prüfungen unterzogen werden, um ihre Verwendungsfähigkeit für die nachfolgenden Hybridisierungsexperimente zu demonstrieren. Gegenüber S1-Nuclease erwies sich die 6/94 RNA als relativ resistent (bis zu 50%); dies Verhalten ist durch das Vorliegen von Sekundärstrukturen zu erklären. Dagegen konnte durch Einwirken von pankreatischer RNase A die RNA bereits nach 20 min. bis auf einen Background abgebaut werden. Dadurch war die Voraussetzung geschaffen, alle ungebundene 6/94 RNA nach Beendigung der Hybridisierung quantitativ zu entfernen. Weiterhin wurde die Schwimmdichte der RNA im Cs_2SO_4 Dichtegradienten mit 1,66 g/cm^3 bestimmt. In dieser Position bandiert einzelsträngige RNA (Szybalski 1968), gleichzeitig diente dieser Wert zu Vergleichszwecken bei der späteren Analyse der Hybride im Dichtegradienten. Zusätzlich

wurde noch Nuclease-verdaute 6/94 ^{3}H-RNA im Cs_2SO_4-Gradienten zentrifugiert und die resistente Aktivität bestimmt; es blieb nur ein einheitlicher Background übrig. Durch die verschiedenen Reinigungsschritte und die anschließende Charakterisierung war damit gezeigt, daß die isolierte 6/94 ^{3}H-RNA als spezifische Probe für den Nachweis von 6/94-spezifischen Nucleinsäuresequenzen einsetzbar ist.
Mit Hilfe dieser RNA sollte nun wieder anhand der drei Zellklone untersucht werden, ob auch im Fall des aus den M.S. Gehirnen isolierten 6/94-Virus in den Fusionszellen virusspezifische DNA-Sequenzen nachweisbar sind.
Aufgrund der extremen Größenunterschiede von zellulärer DNA und virusspezifischer RNA war mit Schwierigkeiten bei der Hybridisierung zu rechnen. Deshalb wurden zunächst einige Modellversuche mit dem homologen System zelluläre RNA/zelluläre DNA durchgeführt. Nach deren positivem Ausgang schlossen sich dann die Hybridisierungen mit Fusionszell-DNA an, zunächst mit DNA aus Cl-E-8 Zellen, dann auch mit der DNA der übrigen Klone sowie von Kontrollzellen. Da die Ergebnisse von Zhdanov und Simpson nicht unwidersprochen blieben (Weiss 1977), wurde versucht, die Aussagekraft der Hybridisierungsexperimente durch Einfügen weiterer Schritte zu erhöhen. Dies geschah in erster Linie durch einen radikalen Nuclease-Verdau, mit dem alle nichtgebundenen Nucleinsäuren nach Beendigung der Hybridisierung entfernt wurden. Weiterhin wurde die Stabilität der Hybride durch das Aufstellen von Schmelzkurven überprüft; durch Negativ-Kontrollen mit DNA aus verschiedenen 6/94-freien Zell-Linien konnte sichergestellt werden, daß eine Hybridisierung der 6/94 RNA nicht mit irgendwelchen ubiquitären DNA-Sequenzen beliebiger Zellen erfolgt.
Aus allen zu untersuchenden Zell-Linien wurde DNA isoliert, gereinigt und durch Alkali-Verdau von RNA befreit. Diese wurde dann zusammen mit der 6/94 ^{3}H-RNA im Hybridisierungsansatz inkubiert, anschließend mit Nuclease verdaut und im Cs_2SO_4-Dichtegradienten analysiert. Die Ergebnisse dieser Versuche sahen folgendermaßen aus: 1. DNA aus den drei Kon-

trollzell-Linien (HeLa, Vero und embryonale Hühnerfibroblasten) bildet mit der 6/94 ^{3}H-RNA keinerlei Nuclease-resistente Hybride; im gesamten Gradienten ist nur eine geringe Backgroundaktivität meßbar, d.h. die 6/94 RNA enthält keine ubiquitär verbreiteten Sequenzen und ist auch nicht durch die Hybridisierungsbedingungen soweit degradiert worden, daß sie statistisch mit jeder beliebigen DNA hybridisiert. 2. DNA aus dem Klon Cl-C-2 zeigt ebenfalls mit der 6/94 RNA keinerlei Hybridisierung, sie enthält folglich keine (oder nicht nachweisbare) virusspezifische Sequenzen. Bei diesen Zellen hat entweder überhaupt keine Umschreibung der viralen Information in DNA stattgefunden, oder solche DNA ist im Anschluß an die Fusionierung eliminiert worden. Es ergibt sich damit eine Übereinstimmung der serologischen und immunologischen Daten mit den Nucleinsäure-Hybridisierungen. Die negativ verlaufene Hybridisierung ist zugleich eine Kontrolle für die Experimente mit den beiden anderen Zell-Klonen. 3. Bei der Hybridisierung von DNA aus Cl-E-8 und Cl-F-2 Zellen zeigen sich im Cs_2SO_4-Dichtegradienten Nuclease-resistente Hybride im Bereich von 1,45-1,55 g/cm^3. Dies zeigt, daß sich in diesen Zellen 6/94-spezifische Nucleinsäure-Sequenzen befinden. Das 6/94 Virus gehört damit zu einer Gruppe von Viren, deren Nucleinsäure-Information in der Zelle unter natürlichen Bedingungen in DNA umgeschrieben werden kann.

Zur Absicherung dieser Ergebnisse wurden von den Hybriden Schmelzkurven aufgenommen, die Schmelzpunkte um 90^{o}C ergaben und damit eine stabile Hybridstruktur anzeigten.
Durch Markierung der viralen RNA mit ^{32}P wurde weiterhin versucht, die unspezifischen Effekte der Tritium-Markierung auszuschalten. Die durchgeführten Hybridisierungsexperimente bestätigten die vorher mit ^{3}H-RNA erzielten Ergebisse und es war bei den positiven Klonen sogar eine leichte Korrelation zwischen Virusproduktion und Virus-DNA Gehalt der Zellen zu beobachten.
Zusätzlich wurde auch eine Abschätzung der pro Zelle enthaltenen Virus-Genomäquivalente durchgeführt. Aus der dazu erstellten Sättigungshybridisierung und den nachfolgenden Be-

rechnungen ergab sich, daß die untere Nachweisgrenze dieses Hybridisierungssystems bei ungefähr einem Genom-Äquivalent pro Zelle liegt (im Hinblick auf die Cl-C-2 Zellen) und daß in den Cl-E-8 Zellen ungefähr 45 DNA-Kopien der 6/94 RNA vorliegen. Diese Abschätzung ist durch die nur ungenau zu bestimmende spezifische Aktivität der ^{3}H-RNA nicht als absolut anzusehen; der ermittelte Wert stimmt in der Größenordnung gut mit den bei chronisch infizierten Zellen gefundenen Werten überein (Zhdanov et al. 1974b, Zhdanov et al. 1974c).

Abschließend sollte noch durch eine Reihe weiterer Experimente die Aussagekraft der Hybridisierungsexperimente erhärtet werden: Wenn nur in den Klonen Cl-E-8 und Cl-F-2 virusspezifische DNA-Sequenzen mit Hilfe von in diesen Zellen radioaktiv markierten Viren bzw. ihrer RNA gefunden werden, so legt dies die Vermutung nahe, daß zelluläre RNA, die von den Viren mitgeschleppt wird, diese Ergebnisse verursacht. Diesen Überlegungen wurde bereits Rechnung getragen durch die aufwendige Reinigung der 6/94 ^{3}H-RNA. Trotzdem ist es prinzipiell möglich, daß sich bei der viralen RNA geringe Mengen zelluläre Verunreinigungen befinden, die zu den beobachteten Ergebnissen führen. Aus diesem Grund wurden die Hybridisierungsexperimente nochmals wiederholt, diesmal aber mit in-vitro synthetisierter 6/94 ^{3}H-cRNA.
Die Synthese der ^{3}H-cRNA erfolgte in einem in-vitro System, in dem unter Verwendung von RNA-Polymerase aus E. coli an einer beliebigen RNA eine complementäre Kopie synthetisiert werden kann (Bernard et al. 1977). Durch Verwendung von 6/94 RNA als Template, die aus in Hühnereiern gezüchteten Viren extrahiert worden war, sollten Fehlergebnisse bei den nachfolgenden Hybridisierungsexperimenten durch Kontamination mit zellulärer RNA ausgeschlossen werden.
Zunächst wurde die cRNA-Synthese an 6/94 RNA in Vorversuchen erprobt. Es ergaben sich Kinetiken, bei denen die cRNA Synthese, gemessen am Einbau von markiertem ^{3}H-rCMP, ständig zunahm oder auch nach 40 bis 50 min. zurückging. Für die synthetisierte ^{3}H-cRNA konnte unter den vorliegenden Bedingungen eine spezifische Aktivität von $9{,}7 \times 10^{6}$ cpm/µg er-

rechnet werden. Die in der Publikation aufgeführten Werte für Ionenoptima und Inkubationstemperatur wurden nachgeprüft. Für das Mn^{++}-Optimum ergab sich eine deutliche Abweichung. Durch Variation der in das in-vitro System eingesetzten Template-Menge konnte die Korrelation zwischen Einbaurate und RNA-Konzentration nachgewiesen werden. Durch Einsetzen von verschiedenen Polymerase-Konzentrationen konnte eine gute Ausnutzung des RNA-Templates erreicht werden. Dann wurde unter Berücksichtigung der gefundenen Optima in einem präparativen Ansatz 6/94 ^{3}H-cRNA synthetisiert. Diese wurde gereinigt und vor der Verwendung in Hybridisierungsexperimenten noch charakterisiert.

Durch Sedimentation im neutralen Sucrosegradient wurde der s-Wert der cRNA bestimmt. Der Hauptteil der Moleküle lag zwischen 3 und 5s, eine geringe Zahl erreichte Werte bis zu 14s. Diese Ergebisse stimmen mit den von Bernard et al. für in-vitro synthetisierte cRNAs angegebenen s-Werten überein. Anschließend wurde die cRNA unbehandelt und nach Nucleaseverdau im Dichtegradienten zentrifugiert. Die Schwimmdichte der unbehandelten cRNA lag bei 1,66 g/cm^3, während nach Nucleaseverdau im gesamten Gradienten nur mehr Background-Aktivität meßbar war.

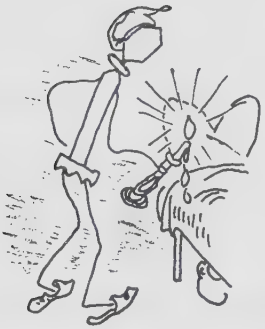
Daraufhin wurde mit der 6/94 ^{3}H-cRNA das gesamte Spektrum der Hybridisierungen wiederholt. Es ergaben sich die gleichen Resultate wie bei Verwendung von in-vivo markierter RNA: Die Hybridisierungen mit DNA aus Cl-E-8 und Cl-F-2 Zellen ergaben Nuclease-resistente Hybride im Dichtegradienten. Mit DNA aus Cl-C-2 Zellen und den drei Kontroll-Zell-Linien war dagegen nur Background-Aktivität nachweisbar. Damit ist ein zusätzlicher Beweis für die Spezifität der Hybridisierungsexperimente erbracht: Die in den Zellen durch Hybridisierung gefundenen DNA-Sequenzen sind virusspezifisch.

Damit gehört auch das 6/94-Virus zur Gruppe jener Paramyxo- bzw. anderen RNA-Viren, deren Nucleinsäure in der Zelle in DNA umgeschrieben werden kann. Es stellt sich dabei die Frage, ob hier eine besondere Fähigkeit einzelner Virusarten vorliegt, oder ob es sich um ein allgemeingültiges Prin-

zip handelt. Bei keiner der bisher in diesem Zusammenhang untersuchten Virusarten konnte die Existenz einer Reversen Transcriptase, d.h. eines Enzyms, das die Umschreibung von RNA in DNA durchführen kann, nachgewiesen werden (Bukrinskaya 1973). Auch blieb die Suche nach beteiligten RNA-Tumorviren bisher erfolglos (Zhdanov et al. 1974b). Dadurch ist bis heute ungeklärt, woher das für die Umschreibung benötigte Enzym stammt. Allerdings forderte Temin bereits vor mehreren Jahren mit seiner "Protovirus-Hypothese" die Existenz einer zellulären Reversen Transcriptase (Temin 1971). Dieses Enzym soll in allen Zellen als normaler Bestandteil vorkommen und seine Funktion bei der Entwicklung und beim interzellulären Informationsaustausch erfüllen. Bis zum heutigen Tag konnte die ubiquitäre Verbreitung eines solchen Enzyms nicht nachgewiesen werden. Trotzdem sind einzelne Untersuchungen bekannt geworden, die eine Reverse Transcriptase von möglicherweise zellulären Ursprung in verschiedenen Tierspecies nachweisen konnten (Moroni et al. 1976, Bauer et al. 1978, Bauer et al. in press, Bauer et al. in preparation). Sollten sich diese Befunde auch auf menschliche Zellen ausweiten lassen, so wäre ein wichtiger Schritt für das Verständnis der viralen Persistenz gewonnen.

Das hypothetische Gesamtkonzept für eine persistente Infektion würde sich dann wie folgt darstellen: Viren dringen in den Organismus ein und unterlaufen das Immunsystem oder werden von diesem toleriert. So kommt es zu einer Infektion von Zellen des ZNS, in denen aber keine oder nur eine begrenzte Virusvermehrung stattfindet. Die virale RNA wird von einer (zellulären) Reversen Transcriptase in DNA umgeschrieben, die dann in das Zellgenom integriert werden kann. Dadurch ist die virale Information dauerhaft konserviert. Nach einer gewissen Zeit kommt es durch endogene oder exogene Reize zu einer teilweisen Expression der viralen Information. Virusspezifische Proteine werden synthetisiert und dem üblichen Ablauf folgend in die Zellmembran eingebaut. Durch diese Änderung des zellulären "Make up" werden diese Zellen als fremd erkannt und sind dann Ziel für Angriffe durch immun-

kompetente Zellen des Organismus. Dadurch kommt es zur Selbstzerstörung von Nervengewebe, zur Autoimmunkrankheit.
Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene System der drei Fusionszell-Linien und des daraus isolierten 6/94-Virus kann nur einige wenige Punkte des hypothetischen Konzepts untermauern: Gehirnzellen von M.S. Patienten zeigen nach Kultivierung geringe morphologische Veränderungen, verhalten sich aber sonst unauffällig (= die virale Information ist reprimiert). Nach Zellfusionierung erscheinen erst im Zellkern, dann im Zytoplasma Nucleocapsid-ähnliche Strukturen (= die virale DNA Information wird exprimiert, es wird virusspezifische RNA synthetisiert; diese wandert in das Zytoplasma als Replikationsort für virale RNA). In späteren Passagen sind die Nucleocapside nur noch im Plasma zu erkennen, es werden infektiöse Viren ausgeschleust, die Fusionszellen enthalten virusspezifische RNA und DNA (= die übliche Replikation von Paramyxoviren findet im Zytoplasma statt; die Fusionszellen enthalten die vollständige Virusinformation = infektiöse Viren; neben replizierender viraler RNA bleibt die virusspezifische DNA erhalten).
Für weitere Untersuchungen in dieser Richtung wird es unbedingt erforderlich sein, ein Virus-Zellsystem zu benutzen, bei dem eine persistente Infektion erzeugt und das latente Virus dann wieder aktiviert werden kann. Für das 6/94-Virus ist der Aufbau eines solchen Modellsystems denkbar. Dann könnte aufbauend auf den hier gewonnenen Erkenntnissen und mit der verwendeten Methodik schrittweise der Weg eines Virus in die Persistenz, d.h. das Auftreten verschiedener virusspezifischer Nucleinsäuren verfolgt werden. Ebenso könnte untersucht werden, ob das ganze Virusgenom in DNA umgeschrieben wird und welche Mechanismen zur Integration bzw. Expression führen.



"Slow virus
auf dem Weg in die Persistenz"

LITERATUR - VERZEICHNIS

Alter M., Leibowitz U., Speer J. (1966): Risk of Multiple Sclerosis related to age at immigration to Israel. Arch.Neurol. 15, 234-

Alter M. (1976) : Is Multiple Sclerosis an age-dependent host response to Measles? Lancet 1, 456-

Alter M., Harshe M., Anderson E., Emme L., Yunis E.J. (1976a): Genetic association of Multiple Sclerosis and HLA-determinants. Neurology 26, 31-

Alter M., Rosenberg B.S. (1977): Are all degenerative neurologic diseases slow virus infections? Geriatrics, 32, 77-

Alter M., Loewenson R., Kahana E. (1977a): Migrants and Multiple Sclerosis. Neurology, 27, 341-

Axel R., Schlom J., Spiegelman S. (1972): Presence in human breast cancer of RNA homologous to mouse mammary tumor virus RNA. Nature, 235, 32-

Barbosa L.H., Hamilton R. (1973): Virological studies with Multiple Sclerosis brain tissues. Lancet, 1, 1415-

Barlow J.S. (1971): The geographic distribution of Multiple Sclerosis - some contributions from the recent non-english literature. Neurology, 21, 353-

Bauer G., Friis R.R., Jilek G., Hofschneider P.H. (1978): Purification and characterization of particles containing RNA-dependent DNA polymerase, in the allantoic fluid of uninfected Leukosis virus-free Chicken eggs. BBA, 518, 125-

Bauer G., Temin H.M.: RNA-dependent DNA polymerase from particles released by normal Goose cells. J.Vir., in press

Bauer G., Mattesberger H., Soo R., Jendis J., Hofschneider P.H.: Release of particles associated RNA-dependent DNA Polymerase by primary Chicken and Quail Embryo cells. (in preparation)

Bauer H.J., ter Meulen V., Koprowski H., Argyrakis A., Orthner H. (1975): Early sterile autopsy in etiological studies on Multiple Sclerosis. J. Neurol., 208, 159-

Bernard O., Cory S., Adams J.M. (1977): Synthesis of complementary RNA on RNA templates using the DNA-dependent RNA polymerase of Escherischia Coli. B.B.A., 478, 407-

Bogen C., Gilden D.H., Wroblewska Z., Wolinsky J.S. (1977): Experimental Infection of human Leucocytes with Parainfluenza 1 (6/94) virus. Infec.Immun. 18, 501-

Bratt M.A., Robinson W.S. (1967): Ribonucleic acid synthesis in cells infected with Newcastle Disease virus. J.Mol.Biol. 23, 1-

Brody J.A. (1972): Epidemiology of Multiple Sclerosis and a possible Virus Aetiology. The Lancet 2, 173-

Brown P., Gajdusek D.C. (1974): No mouse leucozyte depression after inoculation with brain tissue from Multiple Sclerosis or spongiform Encephalopathies. Nature 247, 217-

Bukrinskaya A.G. (1973): Nucleocapsids of large RNA Viruses as functionally active units in transcription. Advances in Virus Research 18, 195-

Carp R.I., Lucursi P.C., Merz P.A. (1972): Decreased percentage of polymorphonuclear neutrophils in mouse peripheral blood after inoculation with material from Multiple Sclerosis patients. J.Exp.Med. 136, 618-

Cendrowski W., Polna I., Nowicka K. (1976): Measles Virus Infection and Multiple Sclerosis. J.Neurol. 213, 369-

Cook S.D., Dowling P.C., Russell W.C. (1978): Multiple Sclerosis and Canine distemper. Lancet 1, 605-

Collett M.S., Faras A.J. (1975): In vitro Transcription of DNA from the 70s RNA of Rous Sarcoma Virus: Identification and Characterization of various size classes of DNA Transcripts. J.Virology 16, 1220-

Croce C.M., Sawicki W., Kritchevsky D., Koprowski H. (1971): Induction of homocaryocyte, heterocaryocyte and hybrid formation by lysolecithin. Exp.Cell Re. 67, 427-

Dean G., Malk M. (1967): Poliomyelitis among white Immigrants to south Africa. S.Afr.Med.J. 41, 294-

Deeney A.O'C., Stromberg K., Beandrean G.S. (1976): Identification of DNA in the core component of Avian Myeloblatosis Virus. B.B.A. 432, 281-

Dick G.W., Mc Keown F., Wilson D.C. (1958): Virus of acute Encephalomyelitis of man and Multiple Sclerosis. Br.Med.J. 1, 7-

Faust C.H., Diggelmann H., Mach B. (1973): Isolation of poly-adenylic-acid rich RNA from mouse Myeloma and synthesis of complementary DNA. Biochem. 12, 925-

Field E.J., Miller H., Russell D.S. (1962): Observation on glial inclusion bodies in a case of acute disseminated sclerosis. J.Clin.Path., 15, 278-

Gajdusek D.C., Gibbs C.J. jr., Alpers M. Hrsg. (1965): Slow latent, temperate virus infections. Bethesda, Md. 1965 (1966) S.489 (NINDB Monograph. 2. Public Health Service Publication, 1378)

Gibbs C.J., Gajdusek D.C., Alpers M.P. (1969): Attemps to transmit subacute and chronic neurological diseases to animals. Arch.Allergy 36, 519-

Gilden D.H., Wroblewska Z., Chesler M., Wellish M.C., Lief F.S., Wolinsky J.S., Rorke L.B. (1976): Experimental Panencephalitis induced in suckling mice by Parainfluenza Type I (6/94) Virus; II. Virology Studies. J.Ne.Exp.Ne. 35, 259-

Gilham P.T. (1964): The Synthesis of polynucleotide-celluloses and their use in the fractionation of polynucleotides. J.Mol.Chem.Soc. 86, 4982-

Gillespie D., Spiegelman S. (1965): A quantitative assay for RNA-DNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. J.Mol.Biol. 12, 829-

Gregg N. Mc. (1944): Further observations on congenital defects in infants following maternal rubella. Trans.Ophtal.Soc.Austr. 4, 119-

Gudnadottir M., Helgadottir H., Bjarnasson O., Jonsodottir K. (1964): Virus isolated from the brain of a patient with Multiple Sclerosis. Exp.Neurol. 9, 85-

Henle G., Koldovsky U., Koldovsky P., Henle W., Ackermann R., Haase G. (1975): Multiple-Sclerosis associated agent: Neutralization of the agent by human sera. Infec.Immun. 12, 1367-

Heller I.H., Elliott K.A.C. (1954): Desoxiribonucleicacid content and cell density in Brain and human brain tumors. Can.J.Biochem.Physiol. 32, 584-

Hewlett-Packard (1975): Programmsammlung HP-25.

Homma M. (1971): Trypsin action on the growth of Sendai Virus in tissue culture cells. I. Restoration of the Infectivity for L cells by direct action of Trypsin on L cell borne Sendai Virus. J.Vir. 8, 619-

Hutchinson W.M., Haire M. (1976): Measles Virus specific IgG in optic neuritis and in Multiple Sclerosis after optic neuritis. Br.Med.J. 1, 64-

Iwasaki Y., Koprowski H., Müller D., ter Meulen V., Käckell Y.M. (1973): Morphogenesis and structure of a virus in cells cultured from brain tissue from two cases of Multiple Sclerosis. Lab.Invest. 28, 494-

Kantorovich-Prokudina E.N., Semyonova N.P., Yamnikova S.S., Berezina O.N., Zhdanov V.M. (1978): DNA sequences in Influenza Virions (Techn. Note). J.Gen.Virol. 41, 405-

Kingsbury D.W., Portner A. (1970): On the genesis of incomplete Sendai Virions. Virology 42, 872-

Kingsbury D.W., Portner A., Darlington R.W. (1970a):Properties of incomplete Sendai Virions and subgenomic viral RNAs. Virology 42, 857-

Kingsbury D.W. (1972): Paramyxovirus replication (Review). Curr.T.Micr. 59, 1-

Kingsbury D.W., Lerner R.A. (1974): Encapsulation of Lymphocyte DNA by Vesicular Stomatitis Virus. Proc.Nat.Acad.Sci.71, 1753-

Kirk J., Hutchinson W.M. (1978): Fine-structure of CNS in Multiple Sclerosis. 1. Interpretation of cytoplasmic Papova-Virus-like and Paramyxo-Virus-like inclusions (Article). Neurop.Ap.N. 4, 343-

Knowles B.B., Jensen F.C., Steplewski Z., Koprowski H. (1968): Rescue of infectious SV 40 after fusion between different SV 40-transformed cells. Proc.Nat.Acad.Sci.61, 42-

Kolakofsky D., Spahr P.F., Koprowski H. (1974): Comparison of 6/94 Virus and Sendai Virus RNA by RNA-RNA Hybridization. J.Virology 13, 935-

Koprowski H., ter Meulen V. (1975): Multiple Sclerosis and Parainfluenza-1 Virus. J.Neurol. 208, 175-

Koprowski H., Warren KG. (1978): Can a defectve Herpes-Simplex Virus cause Multiple-Sclerosis (Article). Persp.Biol. 22, 10-

Kunitz M. (1940): Christalline Ribonuclease. J.Gen.Physl. 24, 15-

Kuroya M., Ishida N. (1953): Newborn Virus Pneumonitis (Type Sendai). II. Report: The isolation of new virus possessing hemagglutinin activity. Yokohama Med.Bull. 4, 217-

Kurtzke J.F., Kurland L.T., Goldberg J.D. (1971): Mortality and migration in Multiple Sclerosis. Neurology 21, 1186-

Kurtzke J.F., Hyllestad K. (1975): Multiple Sclerosis: An epidemic disease in the Faeroes. Trans.Am.Neurol.Assoc. 100, 213-

Lamb R.A., Mahy B.W.J. (1976): The polypeptides and RNA of Sendai Virus. Negativ strand Viruses, Vol. 1, 66-; Academic Press Inc. (London), 1975.

Lampert F., Lampert P. (1975): Multiple Sclerosis: Morphologic Evidence of Paramyxovirus or altered Chromatin Fibers? Arch.Neurol. 7, 425-

Lebermann R. (1965): Use of Uranyl Formiat as a negativ stain. Negativ staining. J.Mol.Biol. 13, 606-

Lewandowski L.J., Lief F.S., Verini M.A., Pienkowski M., ter Meulen V., Koprowski H. (1974): Analysis of a viral agent isolated from Multiple Sclerosis brain tissue: Characterization as a Parainfluenzavirus Type 1. J.Virology 13, 1037-

Lewandowski L.J., Gerhard W.U., Palmer J.C. (1976): Cell mediated cytotoxicity against Murine cells infected with 6/94 Virus, a Parainfluenza Type 1 isolated from Multiple Sclerosis brain tissue. Infec. Immun. 13, 712-

Lief F.S., Loh W., ter Meulen V., Koprowski H. (1975): Antigenic Varation among Parainfluenza Type 1 (Sendai) Viruses: Analysis of 6/94 Virus. Intervirolo. 5, 1-

Lief F.S., Rorke L.B., Kalter S.S. et al. (1976): Infection and disease induced in Chimpanzees with 6/94, a Parainfluenza Type 1 Virus isolated from human Multiple Sclerosis brain. J.Ne.Exp.Ne. 35, 644-

Madden D.L., Krezlewiez A., Gravell M., Sever J.L., Tourtellotte W.W. (1978): Multiple Sclerosis associated agent (MSAA): Failure to confirm an association with Multiple Sclerosis. Neurology 28, 295-

Margulis M.S., Soloviev V.D., Schubladze A.K. (1946): Aetiology and pathogenesis of acute sporadic disseminated Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. J.Ne.Ne.Psy. 9, 63-

Mayr A., Bachmann P.A., Bibrack B., Wittmann G. (1974): Virologische Arbeitsmethoden, Bd. I; VEB Gustav Fischer Verlag Jena.

Mayr A., Bachmann P.A., Bibrack B., Wittmann G. (1977): Virologische Arbeitsmethoden, Bd. II; VEB Gustav Fischer Verlag Jena.

McDonnel J.P., Garapin A.C., Levinson W.E., Quintrell N., Fanshier L., Bishop J.M. (1970): DNA Polymerases of Rous Sarcoma Virus: Delineation of two reactions with Actinomycin. Nature 228, 433-

Meinke W., Smith R.A., Lancarter W., Goldstein D., Tourtellotte W., Spizizen J. (1976): Papovaviruses and Multiple Sclerosis. Neurology 26, 378-

Meselson M., Stahl F.W., Vinograd J. (1957): Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. Proc.Nat.Acad.Sci. 43, 581-

Moroni Ch., Schumann G. (1976): Mitogen induction of Murine c-Type Viruses. Virology 73, 17-

Myers J.C., Spiegelman S., Kacian D.L. (1977): Synthesis of full-length DNA copies of avian Myeloblastosis Virus RNA in high yields. Proc. Nat.Acad.Sci. 74, 2840-

Nathanson N., Miller A. (1978): Epidemiology of Multiple Sclerosis - critique of evidence for a viral etiology (Review). Am.J.Epidem. 107, 451-

Nemo G.J., Brody J.A., Waters D.J. (1974): Serological responses of Multiple Sclerosis patients and controls to a virus isolated from a Multiple Sclerosis case. Lancet 2, 1044-

Neubert W. (1976): Reverse Transcription der RNA des Paramyxovirus 6/94 in vitro. Diplomarbeit, München.

Nonoyama M. (1975): Detection of tumor virus genomes by nucleic acid hybridization. Int.R.Exp.P. 14, 69-

Norrby E. (1978): Viral antibodies in Multiple Sclerosis (Review). Prog. Med.Vi. 24, 1-

Poeck K. (1978): Neurologie; Springer Verlag, 5. Auflage.

Pozkanzer D.C., Schapira K., Miller H. (1963): Multiple Sclerosis and Poliomyelitis. Lancet 2, 917-

Portner A., Kingsbury D.W. (1971): Homologous Interference by incomplete Sendai Virus particles: Changes in virus specific ribonucleic acid synthesis. J.Virology 8, 388-

Pridgen C., Kingsbury D.W. (1972): Adenylate-rich sequences in Sendai-Virus transcripts from infected cells. J.Virology 10, 314-

Prineas J. (1972): Paramyxovirus-like particles associated with acute demyelination chronic relapsing Multiple Sclerosis. Science 178, 760-

Robinson W.S. (1970): Self-annealing of subgroup 2 Myxovirus RNAs. Nature 225, 944-

Robinson W.S. (1971): Ribonucleic acid polymerase activity in Sendai Virions and nucleocapsid. J.Virol. 8, 81-

Rorke L.B., Gilden D.H., Wroblewska Z., Wolinsky J.S. (1976): Experimental Panencephalitis induced in suckling mice by Parainfluenza Type I (6/94) Virus. I. Clinical and pathological features. J.Ne.Exp.Ne. 35, 247-

Rothenberg E., Baltimore D. (1976): Synthesis of long, representative DNA copies of the murine RNA tumor virus genom. J.Virology 17, 168-

Schlom J., Michalides R., Cölcher D., Feldman S., Spiegelman S. (1975). Evidence for an RNA tumor virus in human milk. Bibl.Haem. 40, 471-

Sigurdsson B. (1954): Rida, a chronic Encephalitis of sheep. Br.Vet.J. 110, 341-

Simpson R.W., Iinuma M. (1975): Recovery of infectious proviral DNA from mammalian cells infected with respiratory syncytial virus. Proc.Nat. Acad.Sci. 72, 3230-

Studier F.M. (1965): Sedimentation studies of the size and shape of DNA. J.Mol.Biol. 11, 373-

Szybalski W.: Use of Cesium Sulfate for equilibrium density gradient centrifugation. Meth.Enzym. 124, 330-

Taniguchi T., Libonati M. (1974): Action of Ribonuclease BS-1 on RNA-DNA Hybrid. Bioc.Biop.R. 58, 280-

Tanaka R., Iwasaki Y., Koprowski H. (1976): Intracisternal virus-like particles in brain of a Multiple Sclerosis patient. J.Neur.Sci. 28, 121-

Tanaka R., Santoli D., Koprowski H. (1976a) Unusual intranuclear filaments in the circulating Lymphocytes of patients with Multiple Sclerosis and optic Neuritis. Am.J.Path. 83, 245-

Temin H.M. (1971): The protovirus hypothesis: Speculations on the significance of RNA-directed DNA synthesis for normal development and for carcinogenesis. J.Nat.Canc. 46, III-

ter Meulen V., Koprowski H., Iwasaki Y., Käckell Y.M., Müller D. (1972): Fusion of cultured Multiple Sclerosis brain cells with indicator cells: Presence of nucleocapsids and virions and isolation of Parainfluenza-Type Virus. Lancet 2, 1-

Turnbull H.M., McIntosh J. (1926): Encephalo-Myelitis following vaccination.Br.J.Ex.Pat. 7, 181-

Varmus H.E., Quintrell N., Medeiros E., Bishop J.M. (1973): Transcription of mouse Mammary Tumor Virus genes in tissues from high and low tumor incidence mouse strains. J.Mol.Biol. 79, 663-

Verma I. (1978): Genome organization of RNA tumor viruses. 1. In vitro synthesis of full-genome-length single-stranded and double-stranded viral DNA transcripts (Article). J.Virology 26, 615-

v. Magnus P. (1954): Incomplete forms of Influenza Virus. Adv.Virus R. 2, 59-

Vogt V.M. (1973): Purification and further properties of single-strand specific nuclease from Asparagillus oryzae. Eur.J.Bioch. 33, 192-

Watanabe I., Okazaki H. (1973): Virus-like structure in Multiple Sclerosis. Lancet 2, 569-

Waters D.J., Koprowski H., Lewandowski L.J. (1974): Parainfluenza 1 Virus und Multiple Sclerosis: The conversion of 6/94 Virus released from human brain cells and other mammalian cells into an infectious form by passage with macrophages. Med.Microbi. 160, 235-

Weiss R. (1977): Persistent infections without proviral DNA. Nature 265, 295-

Wolinsky J.S., Gilden D.H. (1975): In vivo studies of Parainfluenza I (6/94) Virus: Mononuclear cell interactions. Arch.Virol. 49, 25-

Wolinsky J.S., Gilden D.H., Rorke L.C. (1976): Experimental Panencephalitis induced in suckling mice by Parainfluenza Type I (6/94) Virus. III. Ultrastructural studies. J.Ne.Exp.Ne. 35, 271-

Wroblewska Z., Santoli D., Gilden D., Lewandowski L., Koprowski H. (1976): Persistent Parainfluenza Type 1 (6/94) infection of brain cells in tissue culture. Arch.Virol. 50, 287-

Zgorniak-Nowosielska I., Iwasaki Y., Tachovsky T., Tanaka R., Koprowski H. (1976): Experimental Parainfluenza Type 1 Virus induced Encephalopathy in adult mice. Arch.Neurol. 33, 55-

Zhdanov V.M., Andzhaparidze O.G., Bogomolova N.N. (1974a): Incorporation of viral genome in DNA of chronically infected cells. Experientia 30, 499-

Zhdanov V.M., Bogomolova N.N., Gavrilov V.I. (1974b): Infectious DNA of tick-borne Encephalitis Virus. Arch.Virol. 45, 215-

Zhdanov V.M., Parvanovich M.I. (1974c): Integration of Measles Virus nucleic acid into the cell genome. Arch.Virol. 45, 225-

Zhdanov V.M. (1975): Integration of viral genomes. Nature 256, 471-

Zhdanov V.M. (1976): Integration of genomes of infectious RNA viruses. Intervirolo. 6, 129-

Zhdanov V.M., Bukrinskaya A.G., Kaverin N.V. (1977): Formation of proviruses in acute infection in vitro and in vivo. Experientia 33, 442-

ABKÜRZUNGEN

BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	basencomplementäre DNA
Ci	Curie
cRNA	basencomplementäre RNA
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
CV-1	diploide permanente Affennierenzellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxiribonucleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTE	Dithioerythol
EDTA	Dinatriumsalz der Äthylendinitrilotetraessigsäure
EID_{50}	Eiinfektionsdosis
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
^{3}H	Tritium, radioaktives Isotop vom Wasserstoff
HA	Hämagglutinations-Einheit
HAD	Hämadsorption
HeLa	humane Cervix-Carcinom-Zellen
HEPES	N-2-hydroxiäthylpiperazin-N'-2 Äthansulfonsäure
IF	Immunfluoreszenz
MEM	Minimalmedium für die Zellzucht
mg	Milligramm
min.	Minute
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-RNA
MW	Molekulargewicht
nm	Nanometer
OD_{260}	Optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge
^{32}P	radioaktives Isotop von Phosphor
Pbs^{-}	Standardpuffer
Primer	kurzes DNA-Stück, das als Startermolekül für die Reverse Transcription dient
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rNTP	Ribonucleosidtriphosphat
rpm	Umdrehungen pro Minute

s	Svedbergeinheit
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sendai	Virus der Paramyxogruppe
ss	einzelsträngig
SSC	Standardpuffer
Std.	Stunde
STE	Standardpuffer
TCA	Trichloressigsäure
Template	Nucleinsäurematrize
Tris	Tris-(hydroximethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
Vero	permanente Affennierenzellen
v/v	Volumenanteile
Wi 38	diploide, humane, embryonale Lungenzellen
wt/wt	Gewichtsanteile
6/94	Virus der Paramyxogruppe

DANKSAGUNG

Herrn Prof.Dr.Dr. P.H. Hofschneider danke ich für Arbeitsplatz, Mittel und Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof.Dr. H. Schmieger danke ich für die Vertretung dieser Arbeit an der Universität München und für sein Interesse.

Frau I. Scholz danke ich für elektronenmikroskopische Untersuchungen, Frl. Ch. Baumann für sorgfältige Mitarbeit bei Virus- und Zell-Zucht sowie Frl. P. Knauseder für Mithilfe bei der cRNA-Synthese.

Durch Diskussionen mit Dr. B. van Dorp erhielt ich viele für meine Arbeit wichtige Ratschläge.

Durch Überlassung wertvoller Materialien wurde die Arbeit in der vorliegenden Form erst ermöglicht; mein Dank gilt deshalb:
Prof.Dr. H. Koprowski, Philadelphia (USA)
Prof.Dr. V. ter Meulen, Würzburg

Vielen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe bin ich für Diskussionen und Kritik zu Dank verpflichtet.

LEBENSLAUF

Wolfgang Neubert

09.07.49	geboren in Velenje/Jugoslawien
1955-1959	Besuch der Volksschule in Recklinghausen und in Essen
1959-1967	Besuch des staatlichen Burggymnasiums in Essen
Sommer 1967	Ablegen der Reifeprüfung
Herbst 1967	Beginn des Studiums der Elektrotechnik an der Technischen Universität in Aachen
Herbst 1968	Studienfachwechsel zur Biologie, Studium an der Universität München
Sommer 1971	Diplom-Vorprüfung in Biologie
Frühjahr 1975	Diplom-Hauptprüfung in Biologie an der Universität München
April 1975 bis März 1976	Anfertigung der Diplomarbeit in der Abteilung für Virusforschung am MPI für Biochemie Thema der Arbeit: Reverse Transcription der RNA des Paramyxovirus 6/94 in vitro.
April 1976 bis Mai 1979 -	Weiterbeschäftigung mit der Fragestellung des Nachweises von latenten Viren aufbauend auf den Methoden der Diplomarbeit; daraus entstand die vorliegende Arbeit.
Seit April 197[illegible]	wissenschaftlicher Assistent am MPI für Biochemie